

Wie man eine biologische Uhr stoppen kann: Singularitätspunkt

Wolfgang Engelmann
Universität Tübingen
Botanik

April 2004

Arthur Winfree zum Gedächtnis, der viel über den singulären Punkt biologischer Rhythmen nachdachte und arbeitete. Er starb am 5. November 2002 an einem Gehirntumor

Gross sind die Werke des Herrn
Wer sie erforscht, der hat Freude
daran.

Psalm 111

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung: Tod vom singulären Punkt	5
1.1	Normale Herztätigkeit	5
1.2	Kammerflimmern	7
1.3	Topologie und Flimmern	7
1.4	Zirkulierende Wellen	12
1.5	Anwendungen	15
2	Schlüpfrythmus von <i>Drosophila</i> und Arrhythmie	17
2.1	Phasenresponse-Kurven	18
2.2	Wie man ein weisses Loch findet	20
2.3	Wie man den Schlüpfrythmus mit einer Zeitmaschine messen kann	20
2.4	Singuläres Schlüpfen	21
2.5	Singuläre Bedingungen in aufeinander folgenden Zyklen	25
2.6	Ist ein langer schwacher Reiz wie ein kurzer starker?	25
2.7	Mit singulärem Puls testen, wie Temperatur auf die Uhr wirkt	25
3	Blumenuhr <i>Kalanchoe</i>	29
3.1	Blütenblattbewegung von <i>Kalanchoe</i>	29
3.2	Oszillatormodell von Johnsson und Karlsson: gravitropes Pendel	32
3.3	Phasenresponsekurve und Arrhythmie	33
3.4	Der singuläre Punkt bei <i>Kalanchoe</i>	35
3.5	Mit dem Singularitätspuls herumspielen	37
3.6	Arrhythmie bei verschiedenen Temperaturen	37
3.7	Und was man damit tun kann	40
3.8	Arrhythmisches Aussehen muß nicht auf Arrhythmie beruhen	41
4	Weitere Beispiele für den singulären Punkt	47
	Literaturverzeichnis	51

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1.1	Wie das Herz des Menschen funktioniert	6
1.2	Störungen des Herzschlages durch einen Reiz	8
1.6	Kopplungsintervall und Reizstärke	8
1.3	Weiche und harte Wiederanpassung beim Herzschlag	9
1.4	Repräsentative Kurve schwacher Phasenverschiebungen	10
1.5	Repräsentative Kurve starker Phasenverschiebungen	11
1.7	Weisses Loch beim Reizen eines Herzens	12
1.8	Singulärer Reiz an Purkinje-Fasern eines Hundeherzens	13
1.9	Wie Kammerflimmern entsteht	14
1.10	Gebiete, die auf Kammerflimmern empfindlich sind	16
2.1	Puppen von <i>Drosophila pseudoobscura</i>	17
2.2	Schlüpfen von Fruchtfliegen in Zeitfenstern	18
2.3	Verschiebungen des Schlüpfrrhythmus durch Lichtpulse	19
2.4	Starke und schwache Phasenresponsekurven auf Licht	21
2.7	Arrhythmisches Schlüpfen von Fruchtfliegen nach kritischer Belichtung	21
2.5	Wie man ein weisses Loch findet	22
2.6	Zeitmaschine für das Schlüpfen von Fruchtfliegen	23
2.8	Arrhythmie oder Desynchronie?	24
2.9	Weisse Punkte am ersten, zweiten und dritten Tag nach Dauerdunkel .	26
2.11	Arrhythmie durch verschieden lange und starke Lichtpulse	26
2.10	Beispiele für Arrhythmie durch verschieden singuläre Lichtpulse . . .	27
2.12	Arrhythmie des <i>Kalanchoe</i> -Oszillators bei verschiedenen Temperaturen	27
3.1	<i>Kalanchoe</i> in Blüte	29
3.3	Rhythmische Blütenblattbewegung in konstanten Bedingungen	30
3.4	Registrieren der Blütenblattbewegung mit Video-Kamera und Computer	30
3.5	Kurven der <i>Kalanchoe</i> -Blütenblattbewegung nach Bildanalyse	31
3.6	Phasenverschiebung der Blütenblattbewegung mit Lichtpulsen	31
3.2	Auch abgeschnittene Blüten bewegen sich noch tagesperiodisch	32
3.8	Pendelbewegungen nach Schwerkraftreizung	32
3.7	Pendelbewegung eines Sonnenblumenkeimlings	33
3.9	Rückkopplungsmodell der Pendelbewegung	34
3.10	Rückkopplungsmodell für die Bewegung der <i>Kalanchoe</i> -Blütenblätter	34
3.11	Ein spezieller Lichtpuls macht <i>Kalanchoe</i> -Blüten arrhythmisch	34
3.12	Arrhythmie der <i>Kalanchoe</i> -Blüten im 1., 2. und 3. Zyklus	35
3.13	Arrhythmie der <i>Kalanchoe</i> -Blüten im 1., 2. und 3. Zyklus	36
3.14	Arrhythmie der <i>Kalanchoe</i> -Blüten: Beginn, Dauer und Intensität . . .	38

Abbildungsverzeichnis

3.18	Temperatur-Effekte auf <i>Kalanchoe</i> -Oszillator	38
3.15	Arrhythmie der <i>Kalanchoe</i> -Blüten: Dauer versus Intensität	39
3.16	Arrhythmie der <i>Kalanchoe</i> -Blüten: Modell versus Experiment	39
3.17	Arrhythmie des <i>Kalanchoe</i> -Oszillators bei verschiedenen Temperaturen	40
3.19	Beispiele für Arrhythmie und Wieder-Anstoss des <i>Kalanchoe</i> -Oszillators	42
3.20	Wieder-Anstoss des <i>Kalanchoe</i> -Oszillators durch Lithiumsalze	43
3.21	Vanadat beeinflusst den <i>Kalanchoe</i> -Oszillator nicht	43
3.22	Induktion der <i>Kalanchoe</i> -Blütenblattbewegung durch PEG	44
3.23	Methyljasmonat und <i>Kalanchoe</i> -Oszillator	44
3.24	Zwei Lichtpulse treffen den <i>Kalanchoe</i> -Oszillator	45
4.1	Zeitkristall des Atemrhythmus der Katze	48
4.2	Kontourkarte des Atemrhythmus der Katze	49

Dieses Buch wurde mit LyX geschrieben und gesetzt. Es handelt sich um ein professionelles System, um mit einem Computer Dokumente zu erstellen (siehe <http://www.lyx.org/>).

Copyright 2004 Wolfgang Engelmann.

Dank an Lyx User Group (besonders Herbert Voss, für Hilfe bei Lyx/Latex-Fragen)

Abbildungsverzeichnis

Vorwort

Im März 2004 wurde ich von Charlotte Helfrich-Förster gebeten, im Rahmen des Graduiertenkollegs ‘Sensorische Photorezeptoren in natürlichen und artifiziellen Systemen’ an der Universität Regensburg im Mai einen Vortrag über den Singularitätspunkt bei biologischen Rhythmen zu halten. Ich benutzte meine Vorbereitung darauf, ein Buch zusammenzustellen. Es hat zwei Ziele. Einmal kann ich in der kurzen Zeit eines Vortrages nicht genügend auf Einzelheiten eingehen, die aber zum Teil wichtig sind, um das Gebiet besser zu verstehen. Die Zuhörer können das durch das Folgende nachholen. Auch die gezeigten Abbildungen und weitere stehen hier zur Verfügung. Zum anderen merkte ich, dass es sich um ein faszinierendes Thema handelt, das vielleicht auch andere interessiert.

Es sind aber einige Bemerkungen nötig. Die wichtigste: Es gibt über das Gebiet bereits einige Literatur, mit der ich nicht konkurrieren kann und will. Es sind vor allem Arbeiten und Bücher von Arthur T. Winfree, einem Kollegen von mir während meines Gast-Aufenthaltes bei Colin S. Pittendrigh am Biologie-Department der Princeton Universität in New Jersey, USA. Art, wie er genannt wurde, hatte zu dieser Zeit seine Doktorarbeit angefertigt. Ich lernte ihn als einen ausgezeichneten und hochbegabten Wissenschaftler kennen, aber auch als Mensch zu schätzen. Von ihm und seiner (selbst)kritischen Art, Wissenschaft zu treiben, habe ich sehr viel gelernt. Es war für mich eine sehr traurige Nachricht, als ich am 8. November 2002 diesen Brief bekam:

From: Erik Winfree <win-free@centrosome.dna.caltech.edu>

Subject: Re: Art Winfree

Dear Friends of Art Winfree,

We regret to inform you that at approximately 9pm, Tuesday, Nov 5th, Art passed away after many months of fighting a brain cancer that was diagnosed in April. He died at home in peace, attended to lovingly by his devoted wife, Ji-Yun, with his father C. Van and his brother Charlie present. We know that his life was made richer by his interaction with all of you. There will be a gathering for family members this weekend, in Tucson, to mourn his passing.

The Family

P.S. It is impossible to contact all of Art's friends who would want to know. We wish all Art's dear friends to help us spread the news of Art's passing. If you each would kindly pass this email on to others, that you know would have wanted to know, it would be greatly appreciated by his wife and family.

Hier sind drei Bücher angegeben, die Arthur Winfree über das behandelte Thema geschrieben hat. Sie sind sehr empfehlenswert, wobei das zweite und dritte recht anspruchsvoll ist: Winfree (1986) (deutsch: Winfree (1988)), Winfree (1980), Winfree (1987). Zahlreiche der von mir verwendeten Illustrationen sind aus Winfree (1988) und Winfree (1983). Eine kurze Einführung in Grenzzyklen stammt von Lakin-Thomas (1995) und ist empfehlenswert.

1 Einführung: Tod vom singulären Punkt

Am 7. November 1914 wird in der McGill-Universität in Montreal ein 28 Jahre alter Physiologe vom Hausmeister in seinem Labor gefunden. Er liegt in einem Gewirr von elektrischen Kabeln am Labortisch. Auf der Brust ist in Herzhöhe ein Messgerät befestigt, mit dem noch der immer schwächer werdende Herzschlag auf einem Schreiber registriert wird. Georg Mines stirbt, ohne das Bewußtsein wiederzuerlangen.

Was war passiert? Jeden Tag sterben etwa tausend Menschen allein in den USA am Sekundenherztod. Er wird in den meisten Fällen durch das Kammerflimmern des Herzens verursacht. Der Herzschlag verläuft nicht mehr wie am normalen Herzen koordiniert ab. Kammerflimmern kann ohne Warnung auch bei gesunden Personen auftreten.

In diesem Fall kam der Sekundenherztod durch einen Selbst-Versuch. Mines wollte herausfinden, ob auch schwache Stromstöße das Kammerflimmern auslösen können. Er hatte dazu Versuche an Tieren durchgeführt und wollte nun prüfen, ob das auch beim Menschen möglich ist (siehe Winfree (1983)).

1.1 Normale Herztätigkeit

Das Herz der Säuger ist ein komplexes Organ. Es besteht aus den beiden Vorhöfen als 'Einspritzkammern' und den beiden Ventrikeln, den 'Pumpen' (siehe Abbildung 1.1). Die Kontraktionen des Herzens beginnen in den Vorhöfen und greifen dann auf die Ventrikel über. Eine Welle elektrischer Impulse durchläuft dabei

die Muskelzellen des Herzgewebes und koordiniert die vier Kammern. Die Muskelfasern kontrahieren sich, wenn das Innenpotential der Zellen durch ein Aktionspotential stimuliert wird. Die negative Spannung bricht kurzzeitig zusammen (Depolarisation) und wird nach einer Refraktärphase wieder aufgebaut (Repolarisation). Während der Refraktärphase kann ein normaler Reiz kein Aktionspotential auslösen.

Besondere Zellen im Sinusknoten am oberen Rand der Vorhöfe sind Schrittmacher dieser Erregung. Durch sie werden die Vorhöfe dazu gebracht, sich zu kontrahieren. Außerdem wird auch der Atrioventrikular-Knoten zwischen den beiden Vorhöfen erregt. Er ist ein zweiter Schrittmacher und bringt über Purkinje-Fasern¹ die Ventrikelmuskeln zur Kontraktion (siehe Abbildung 1.1).

Die Eigenfrequenz des Sinusknotens bestimmt den Herzschlag. Er beträgt im Ruhezustand etwa eine Sekunde. Nervenimpulse aus dem Gehirn, aus verschiedenen Ganglien und aus inneren Organen können den Herzschlag beschleunigen oder verlangsamen. Das geschieht normalerweise im ganzen Herzen synchron. Bei Infarkt, ungewöhnlich hohen Hormon- oder Ionenkonzentrationen, chemischem Stress, physischem Schaden oder durch einen starken Stromschlag kann aber diese Synchronisation versagen.

¹ein weitverzweigtes nervöses Netzwerk mit besonders schneller Leitung elektrischer Impulse

1 Einführung: Tod vom singulären Punkt

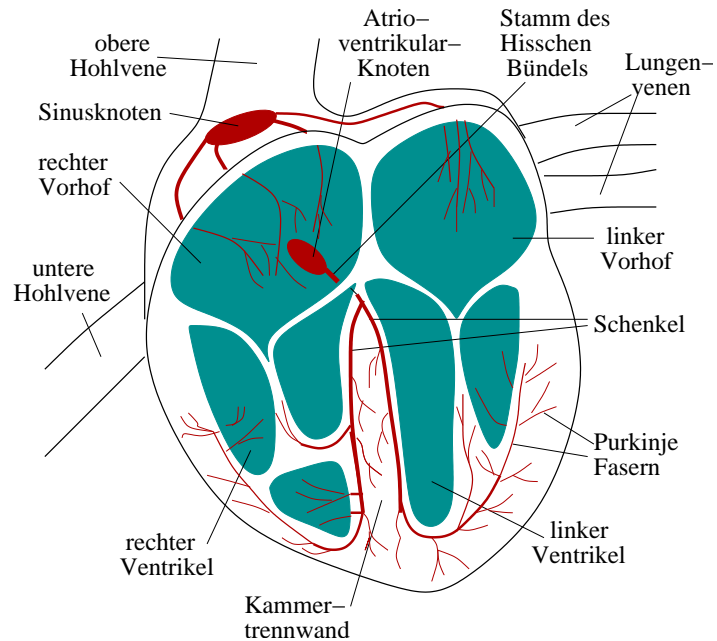


Abbildung 1.1: Das Herz des Menschen besteht aus dem linken und rechten Vorhof als ‘Einspritzkammern’ und dem linken und rechten Ventrikel, den ‘Pumpen’. Sauerstoffarmes Blut aus dem Körper gelangt über die untere und obere Hohlvene in das Herz und wird von ihm über die Lungenvenen in die Lunge gepumpt. Dort wird das Blut wieder mit Sauerstoff angereichert und in den Körper verteilt. Elektrische Impulse entstehen im Sinusknoten als primärer Schrittmacher und synchronisieren die Kontraktionen der Vorhöfe. Ausserdem werden Impulse auch an den Atrioventrikular-Knoten weitergeleitet. Über spezialisierte Strukturen (Stamm des Hischen Bündels, Schenkel) und die Purkinje-Fasern gelangen die Impulse zur Muskulatur der Hauptkammern des Herzens und sorgen dafür, dass es sich (normalerweise) als ganzes gleichmässig und regelmässig mit dem richtigen Schlagrhythmus kontrahiert. Nach Winfree (1983)

1.2 Kammerflimmern

Beim Kammerflimmern ist der koordinierte Herzschlag gestört. Mines hatte in einer Arbeit, die er kurz vor seinem Tod an eine Zeitschrift geschickt hatte, vorgeschlagen, dass Kammerflimmern durch eine im Herzen zirkulierende Welle zustande kommen könnte. Er hatte das Herz von Tieren zwischen zwei Kontraktionen elektrisch gereizt und dabei den Zeitpunkt des Reizes systematisch variiert. Die meisten Reize hatten keine dauernde Wirkung, aber unter gewissen Bedingungen wurde Kammerflimmern ausgelöst. Dazu muss vor allem der Zeitpunkt der Reizung stimmen ('vulnerable Phase der Herzaktion').

1.3 Topologie und Flimmern

Topologie ist ein Teilgebiet der Mathematik. Sie beschäftigt sich mit Eigenschaften, die trotz quantitativer Veränderungen gleich bleiben. Topologische Eigenschaften bleiben auch dann erhalten, wenn eine Figur oder ein physikalisches System stetig deformiert wird. Betrachtet man ein Bild durch eine verzerrende Linse, ist es topologisch immer noch dem unverzerrten Bild äquivalent. Kennt man die topologischen Eigenschaften eines Systems, kann man auch dann Voraussagen machen, wenn man den Mechanismus und die quantitativen Aspekte des Systems nicht kennt.

Die Topologie eignet sich auch dazu, das Flimmern der Herzkammern zu beschreiben. Die Zeitspanne zwischen Herzschlag und Reizbeginn wird *Koppelungsintervall* genannt, die Zeit zwischen Reiz und nächstem Herzschlag *Latenzzeit* (siehe Abbildung 1.2). Je nach dem Zeitpunkt und der Stärke des Reizes werden die folgenden Herzschläge in Bezug auf die eigent-

lich zu erwartende Lage später oder früher kommen (siehe Abbildung 1.3). Bei schwachen Reizen gibt es eine *weiche Wiederanpassung*: Die Schläge nach dem Reiz liegen in der Nähe der Zeitpunkte, zu denen die Schläge zu erwarten wären, wenn das Herz nicht gereizt worden wäre (nach rechts abfallende Diagonalen im linken Teil von Abbildung 1.3). Bei stärkeren Reizen gibt es eine *harte Wiederanpassung*: Die Schläge nach dem Reiz sind insgesamt weiter von dem Zeitpunkt entfernt, zu denen die Schläge zu erwarten wären, wenn das Herz nicht gereizt worden wäre und bewegen sich um horizontale Linien (rechter Teil von Abbildung 1.3). Bei einem ganz starken Reiz kommen alle Folge-Schläge immer zum gleichen Zeitpunkt, unabhängig davon, wann der Reiz gegeben wurde. Tatsächlich wurde harte und weiche Wiederanpassung gefunden, als der Sinusknoten von Kaninchenherzen gereizt und die Lage der folgenden Schläge bestimmt wurde.

Um nun die Ergebnisse aus Abbildung 1.3 zu vereinfachen und mit zahlreichen weiteren Ergebnissen mit anderen Reizstärken zu kombinieren, wurden zunächst einmal die Quadrate 1-2, 2-3 und 3-4 aus Abbildung 1.3 übereinander gelegt (Quadrat 0-1 wurde weggelassen, da hier die Verschiebungen durch den Reiz noch nicht konsolidiert sind). Wenn die Reize die folgenden Schläge des Herzens nur zeitlich verschoben haben, ohne die folgenden Perioden zu beeinflussen, liegen die Schläge (als Punkte dargestellt) übereinander. Wir haben also aus den verschiedenen Latenzen jeweils eine gemacht und dadurch eine repräsentative Kurve erhalten (Abbildung 1.5). Kodiert man die Phasen als Farben des Spektrums und überträgt sie in ein Diagramm mit Koppelungsintervall als horizontale Achse und Reizstärke als vertikale Achse, ergibt sich Abbildung 1.6. Die Punkte am unteren Rand

1 Einführung: Tod vom singulären Punkt

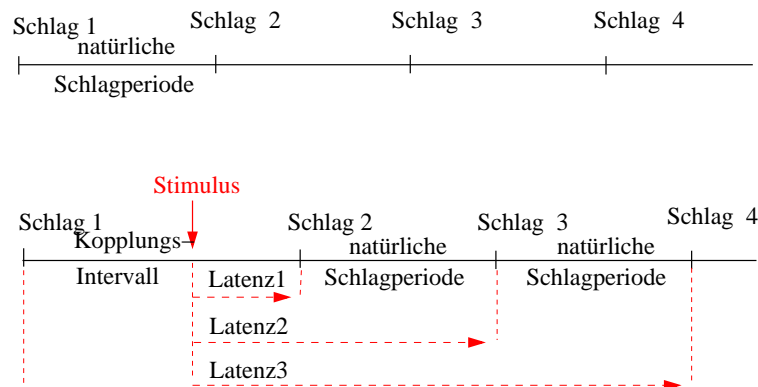


Abbildung 1.2: Koppelungsintervall (Schlag 1 bis Reiz) und Latenz (Zeitspanne zwischen Reiz und Schlag 2, Schlag 3, Schlag 4) bei Störungen des Herzschlages durch einen Reiz. Die natürliche Schlagperiode (Zeitspanne zwischen zwei aufeinander folgenden Schlägen) beträgt etwa eine Sekunde. Der Reiz verschiebt den Schlag um einen bestimmten Betrag, die Schlagperiode bleibt aber erhalten

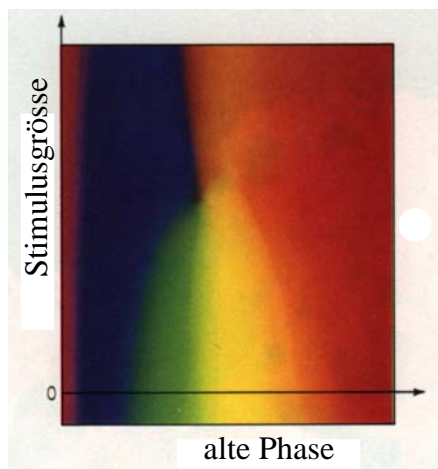


Abbildung 1.6: Koppelungsintervall und Reizstärke: Die Phasen des Herzrhythmus wurden als Farben des Spektrums kodiert. Koppelungsintervall (alte Phase) ist horizontale Achse und Reizstärke vertikale Achse. Aus Winfree (1988)

zeigen die fast nicht vorhandene Reaktion auf einen sehr schwachen Reiz und die Farben laufen deshalb kontinuierlich von rot über das Spektrum wieder zu rot. Am oberen Rand sieht man die Reaktion auf einen sehr starken Puls. Unter dieser harten Wiederanpassung gibt es nur einen Teil des Spektrums, von (links) grün über gelb, orange, gelb, grün und blau wieder zu grün rechts. An den beiden Seiten ist die Farbfolge gleich, da die Koppelungsintervalle von Null und einer vollen Periode sich gleichen.

Die Topologie sagt nun voraus, und das lässt sich auch zeigen, dass auf der Fläche nicht für jeden Punkt ein weicher Übergang möglich ist. Beispielsweise lassen sich auf einer ebenen Kreisfläche nicht alle Punkte auf die Peripherie zurückziehen und gleichzeitig erreichen, dass zwei auf der Ebene benachbarte Punkte auch auf dem Umfang noch benachbart sind. So kann sich ein Seifenfilm in einer Seifenblasenöse nur dann auf den Rand der Öse zurückziehen, wenn er irgendwo angestoßen wird.

In das Rechteck unseres Modells lässt sich

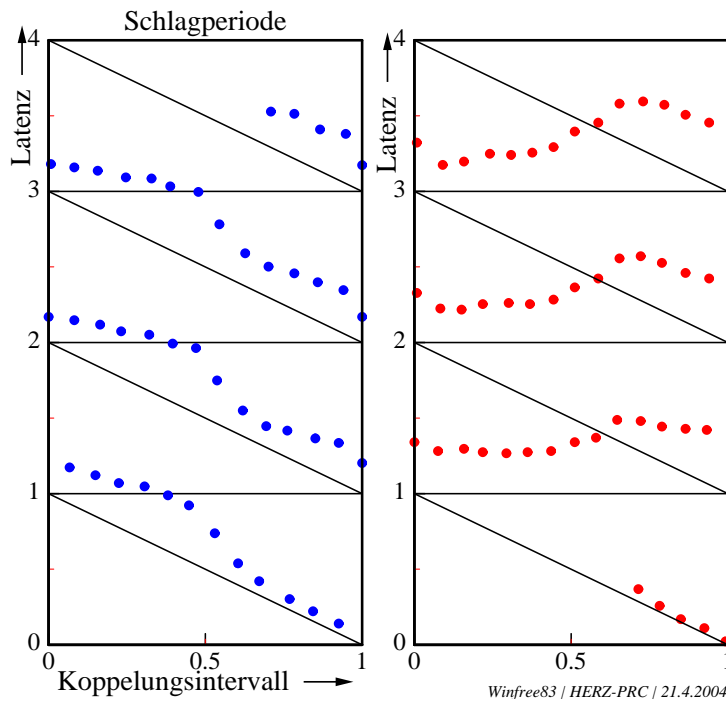


Abbildung 1.3: Zu bestimmten Zeiten (*Koppelungsintervall* = Abstand des Reizes vom vorausgegangenen Herzschlag) wurde das Herz eines Kaninchens schwach (links) oder stark (rechts) gereizt. Nach oben ist die Latenz aufgetragen, also der Abstand zwischen Reiz und den folgenden Schlägen (blaue beziehungsweise rote Punkte). Bei der weichen Wiederanpassung (links) liegen die Schläge *nach dem Reiz* in der Nähe der Zeitpunkte, zu denen die Schläge zu erwarten wären, wenn das Herz nicht gereizt worden wäre (die nach unten rechts abfallenden gestrichelten Linien). Bei stärkeren Reizen (rechts) gibt es eine harte Wiederanpassung: Die Schläge nach dem Reiz sind insgesamt weiter von dem Zeitpunkt entfernt, zu denen die Schläge zu erwarten wären, wenn das Herz nicht gereizt worden wäre und liegen mehr horizontal. Bei einem ganz starken Reiz würden alle Folge-Schläge immer zum gleichen Zeitpunkt kommen, unabhängig davon, wann der Reiz gegeben wurde (nicht gezeigt).

1 Einführung: Tod vom singulären Punkt

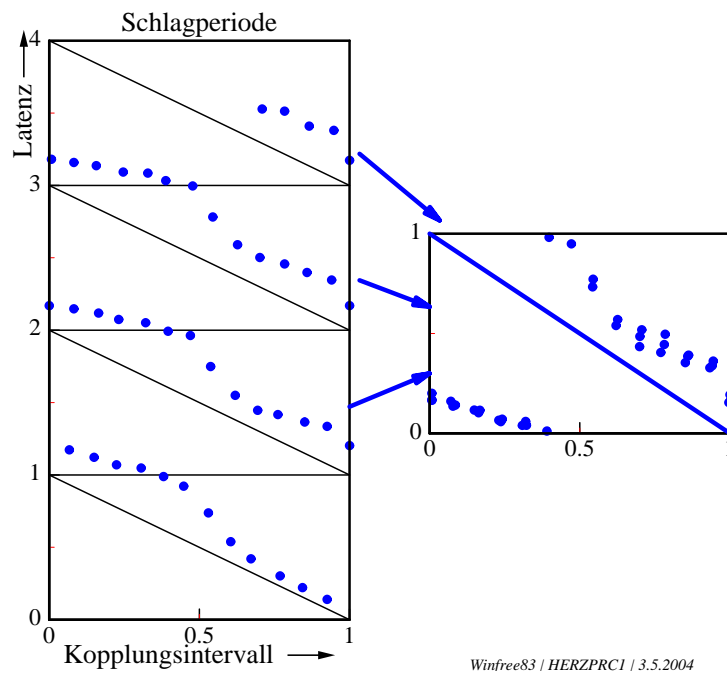


Abbildung 1.4: Die Quadrate 1-2, 2-3 und 3-4 vom linken Teil der Abbildung 1.3 werden übereinander gelegt. Dadurch wird aus den verschiedenen Latenzzeiten eine. Die neuen Phasenlagen der Herzschläge (Latenzzeit minus $n \cdot \text{Periode}$) nach den Reizen sind jetzt in Abhängigkeit von der Phase dargestellt, zu der der Reiz gegeben wurde. Es ergeben sich sogenannte weiche (links) und harte (rechts) Wiederanpassungen. Sie zeigen, dass nach schwachen Reizen die Herzschläge immer noch auf alle Phasen des Spektrums zu liegen kommen.

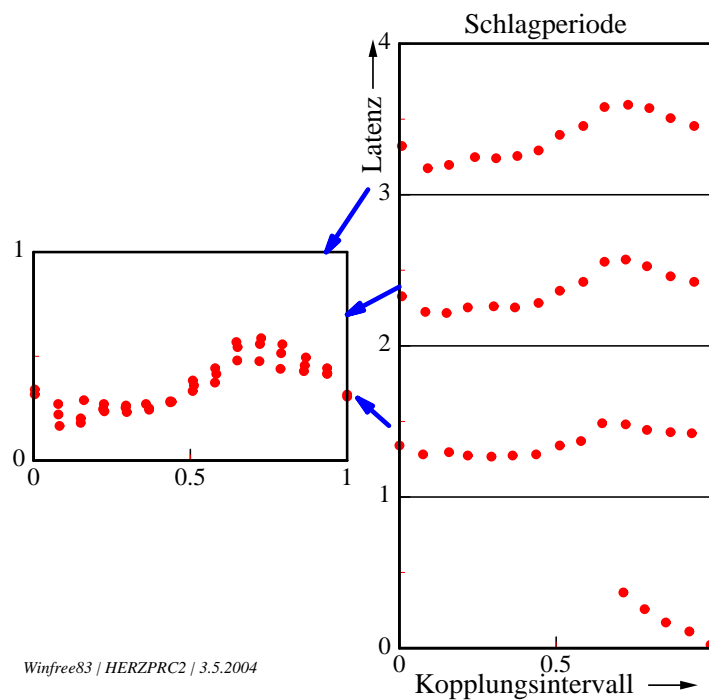


Abbildung 1.5: Die Quadrate 1-2, 2-3 und 3-4 vom rechten Teil der Abbildung 1.3 werden übereinander gelegt (linkes Diagramm). Dadurch wird aus den verschiedenen Latenzzeiten eine. Die neuen Phasenlagen der Herzschläge (Latenzzeit minus $n \cdot \text{Periode}$) nach den Reizen sind jetzt in Abhängigkeit von der Phase dargestellt, zu der der Reiz gegeben wurde. Es ergeben sich sogenannte harte Wiederanpassungen. Sie zeigen, dass nach starken Reizen die Herzschläge nicht mehr in allen Phasen des Spektrums zu liegen kommen, sondern nur noch in einen Teil von ihm.

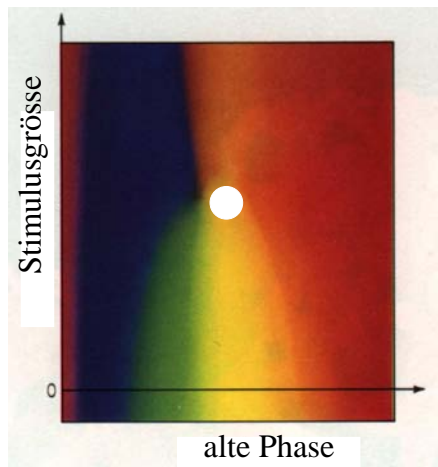


Abbildung 1.7: In einem kritischen Bereich wird beim Reizen eines Herzens ein weisses Loch getroffen. Es ist von allen Phasen (Spektralfarben) umgeben, selbst aber Phasen-los. Aus Winfree (1988)

ein Kreis einzeichnen, um den herum alle Spektralfarben in der richtigen Reihenfolge verlaufen (Abbildung 1.7). Er ist farblos und wird weisses Loch² genannt. Bei einer bestimmten Kombination von Koppelungsintervall und Reizstärke wird dieser Bereich erreicht. Solch ein singulärer Reiz liegt zwischen weicher und harter Wiederanpassung, also nicht am Rand des Rechtecks.

Mit Computer-Simulationen von Nervenzellen-Aktivitäten konnten diese Erwartungen bestätigt werden (Abbildung 1.7, Winfree (1983)). Es ergaben sich 'weisse Löcher' mit einem spektralen Kranz um sich herum. Sie wurden auch inzwischen experimentell an Riesenaxonen des Tintenfisches, in den Purkinje-Fasern von Hunden (Abbildung 1.8) und im Sinusknoten von Katzen

²Arthur Winfree spricht von 'schwarzen Löchern'. Da dieser Name aber bereits für Zustände im Weltall verwendet wird und die Löcher von Winfree in seinen Abbildungen fast immer weiss dargestellt wurden, bevorzugen ich den Namen *weisses Loch*

nachgewiesen. Solche Singularitäten sind im Herzen grösser als erwartet und für Herzflimmern verantwortlich.

1.4 Zirkulierende Wellen

Das Herz hat jedoch ein räumliches Verteilungsmuster. Arrhythmien äußern sich deshalb oft als schnell zirkulierende Wellen und nicht so sehr als unkontrollierte oder aussetzende Schläge. Das Kammerflimmern ergibt sich, wenn die normale Kontraktion des Herzens räumlich desorganisiert ist.

Die zirkulierenden Wellen hängen mit den Singularitäten zusammen. Die Impulse im Herzen werden von jeder Zelle in voller Stärke an die Nachbarzellen weitergeleitet. Damit es zu einem ununterbrochenen Kreisen im Herzen kommt, darf die Umlaufzeit nicht kürzer sein als die Refraktärzeit, die den Aktionspotentialen folgt. Sonst würde die Welle nach einer Runde erlöschen, da sie auf Fasern trifft, die noch refraktär sind. Gewisse Formen der Arrhythmie beruhen auf Wellen, die um ein Hindernis kreisen, zum Beispiel um die Mündung eines Blutgefässes oder um einen abgestorbenen Gewebebezirk. Sie können sogar in kompaktem und gesundem Gewebe des Ventrikelmuskels kreisen.

Wie das Herzflimmern entstehen könnte, ist in Abbildung 1.9 gezeigt und in der Legende erklärt. Dabei ist von Bedeutung, dass die Nerven nicht gleichmässig über das Herzgewebe verteilt sind. Liegen die Nervenendigungen dicht zusammen, ist der Nervenimpuls stärker, bei weniger dicht liegenden schwächer. Es ergibt sich ein Gradient der Reizstärke quer zur Schrittmacherwelle. Es muss dann in diesem Bezirk ein *weisses Loch* geben, in dem ein Reiz keine genaue Latenzzeit ergibt. Um dieses weisse Loch läuft ein Re-

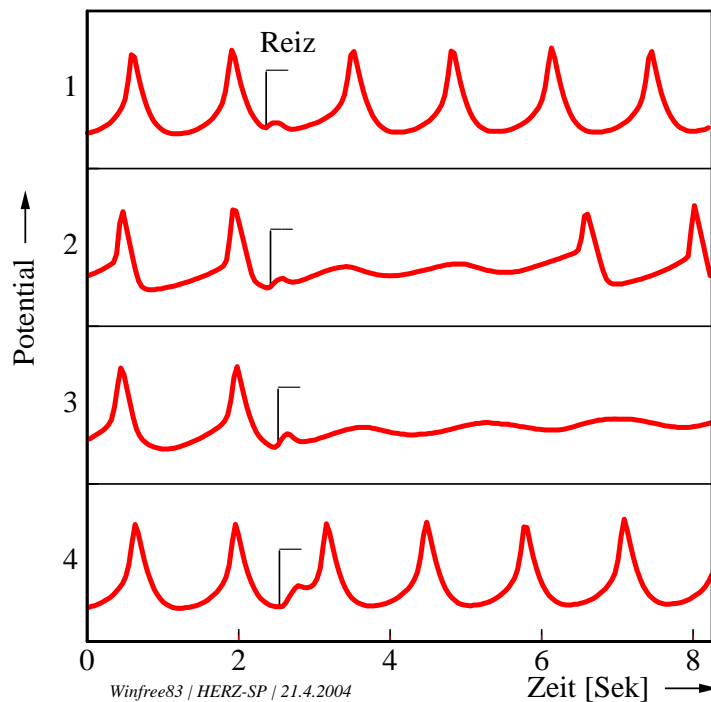


Abbildung 1.8: Singulärer Reiz an Purkinje-Fasern eines Hundeherzens: Die Kurven zeigen die Potentiale von Purkinje-Fasern, die mit einem konstanten Strom dauernd gereizt wurden. Dadurch feuern sie regelmässig. Zum markierten Zeitpunkt wurde jeweils für 200 Millisekunden ein Zusatzreiz geboten. Kurz nach einem Schlag verzögert er den nächsten Schlag. Etwas später gegeben unterdrückt das Feuern für etwa drei Sekunden. Ein noch etwas späterer Reiz stoppt den Rhythmus völlig (*vulnerable Phase*). Ein Reiz nach der vulnerablen Phase verfrüht den nächsten Schlag. Nach Winfree (1983)

1 Einführung: Tod vom singulären Punkt

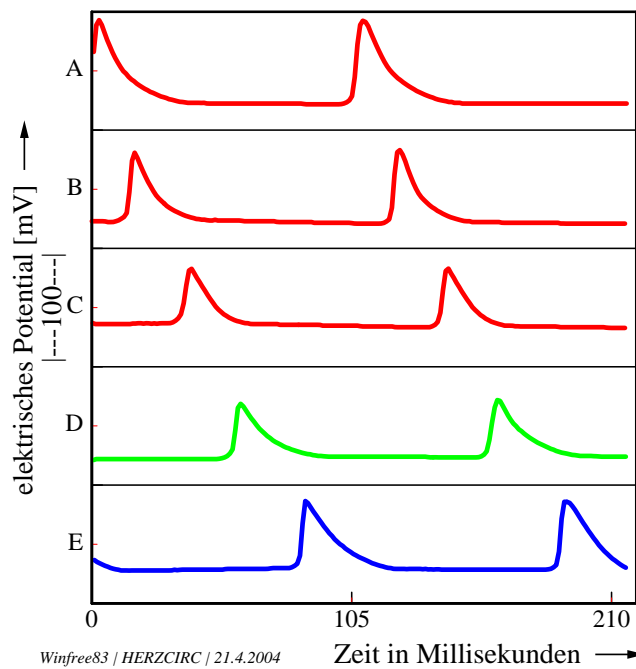
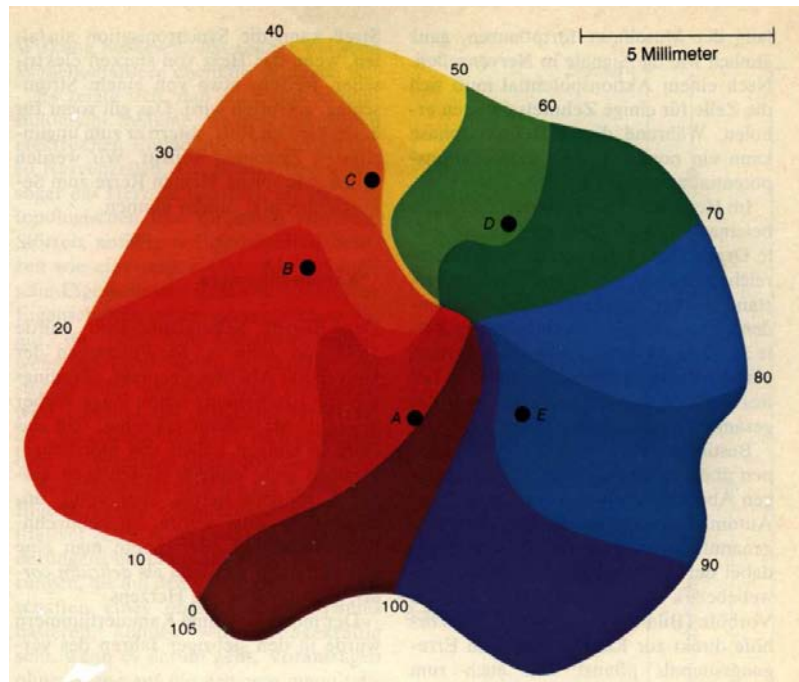


Abbildung 1.9: Kammerflimmern könnte entstehen, wenn Aktionspotentiale im Herzmuskelgewebe kreisen, wie hier am Kaninchenherzen gezeigt. An den Stellen A bis E wurde das umlaufende Potential gemessen und in den unteren Kurven A bis E in 10 Millisekunden-Abständen dargestellt (die Zeiten sind am Rand des oberen Bildes aufgetragen). Ein Umlauf dauert 105 Millisekunden. der scharfe Anstieg in den Kurven kennzeichnet den Durchgang der Wellenfront. Nach Winfree (1983)

gebogen von einer vollständigen Folge von Latenzzeiten. Sie sind mit *Isochronen* (Linien gleicher Phasenlage) verbunden, die sternförmig um das weisse Loch angeordnet sind und auf einen Reiz jeweils mit der selben Verzögerung antworten. Es folgen Entladungen, die um das weisse Loch kreisen. Das Gebiet entspricht nach Berechnungen einer Fläche von etwa 1 cm, und das wurde auch bei kreisenden Einzelwellen im Herzen beobachtet. Wenn das Herz viele inhomogene Stellen besäße, würden sich die Einzelwellen in viele kleinere aufspalten und es könnte zum Kammerflimmern kommen.

In ein Diagramm der Reizstärke gegen das Koppelungsintervall lassen sich nun alle Reize eintragen, die Kammerflimmern verursachen können (Abbildung 1.10). Es ergibt sich eine Scheibe, die aus einem äusseren Bereich besteht, in dem ein Extra-Herzschlag erzeugt wird, einem inneren Bezirk, in dem mehrere Extraschläge entstehen, und einem zentralen Bereich, der zum Flimmern führen kann. Diese Scheibe ist relativ gross. Man kann bei schwierigen Operationen am offenen Herzen mit dem Wissen um solche Bezirke einen künstlichen, aber reversiblen Herzstillstand herbeiführen.

1.5 Anwendungen

Unter welchen Bedingungen aus einer Wiederanpassungs-Singularität eine kreisende Einzelwelle wird, wann diese in viele kleinere zerfällt oder einfach nur wieder verebbt, ist noch nicht geklärt. Wenn man voraussehen könnte, wann es zu Herzflimmern kommt und dieses eventuell medikamentös verhindern könnte, wäre ein wichtiger Schritt getan, um den Sekundenherztod zu verhindern.

1 Einführung: Tod vom singulären Punkt

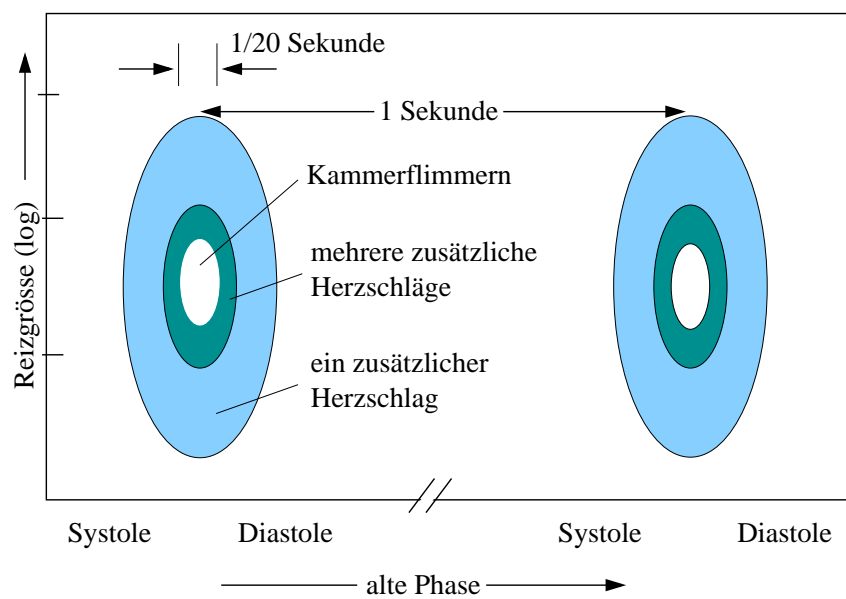


Abbildung 1.10: Gebiete, in denen ein Reiz einer bestimmten Größe (senkrechte Achse) einen zusätzlichen Herzschlag (blau) oder mehrere zusätzliche Herzschläge (cyan) auslösen kann. In einem kritischen Bereich (weisses Loch) kann ein Reiz Kammerflimmern hervorrufen. Das weisse Loch ist nicht größer als 1/20 des Zyklus (von einem Herzschlag bis zum nächsten). Der Reiz, der Kammerflimmern auslösen kann, erstreckt sich über etwa eine Größenordnung. Nach Winfree (1988)

2 Schlüpfrythmus von *Drosophila* und Arrhythmie

Die Fruchtfliege *Drosophila* ist eins der bevorzugtesten Tiere der Biologen. Sie läßt sich leicht und schnell züchten und vermehren, es gibt sehr viele Mutanten und das Genom ist seit einigen Jahren vollständig entschlüsselt. Wie die meisten Organismen besitzt auch die Fruchtfliege Tagesrhythmen, von denen zwei in einem Buch (Engelmann (2003b)) beschrieben sind. Einer dieser Rhythmen steuert das Schlüpfen der Fliegen aus ihrer Puppenhülle, nachdem die Made des letzten Larvenstadiums sich verpuppt und in eine Fliege umgewandelt hatte (Abbildung 2.1).

Diese *Metamorphose* der Made in eine Fliege im Puparium dauert einige Tage. Schliesslich ist die neue Fliege bereit, aus der Puppenhülle zu schlüpfen. Sie wartet aber noch, bis eine innere Tagesuhr ihr 'grünes Licht' gibt. Dann wird am Kopf speziell für das Schlüpfen eine Beule gebildet. Mit ihr wird die Puppenhülle an einer bestimmten Stelle (*Operculum*) aufgedrückt und die Fliege kann das Puparium verlassen. Auch andere Fliegen, die weit genug entwickelt sind, schlüpfen um diese Zeit, nämlich am frühen Morgen. Später und in der kommenden Nacht schlüpfen keine Fliegen. Am nächsten Morgen wird wieder grünes Licht gegeben für die Fliegen, die jetzt fertig entwickelt sind. So geht das einige Tage, bis alle Fliegen geschlüpft sind. Abbildung 2.2 zeigt das Schlüpfen in Zeitfenstern über eine Woche hinweg.

Es handelt sich hier um einen Populations-Rhythmus, da er nur an



Abbildung 2.1: Nachdem Fruchtfliegen mehrere Larvenstadien durchlaufen haben, in denen sie immer grösser wurden, verpuppen sie sich (oben). Im Puparium wandelt sich die Made in eine Fliege um (Metamorphose). Mit einer Beule am Kopf drückt sie das Operculum der Puppenhülle auf und schlüpft ins Freie (unten). Aus Winfree (1988)

2 Schlüpfrythmus von *Drosophila* und *Arrhythmie*

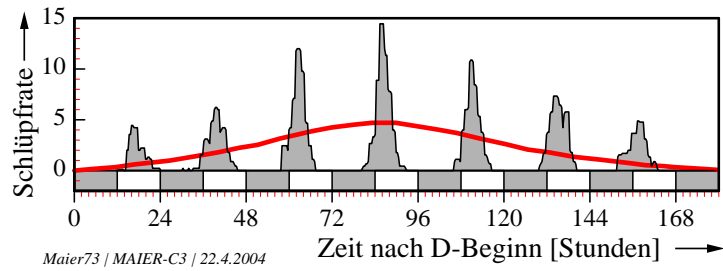


Abbildung 2.2: Fruchtfliegen schlüpfen nur in einem Zeitfenster am frühen Morgen eines Tages (helle Balken über der waagerechten Achse). Später und in der kommenden Nacht (dunkle Balken über der waagerechten Achse) schlüpfen keine Fliegen. Am nächsten Morgen wird von der inneren Uhr wieder grünes Licht zum Schlüpfen für die Fliegen gegeben, die jetzt fertig entwickelt sind. So geht das einige Tage, bis alle Maden sich in Fliegen umgewandelt haben und diese zum Schlüpfen bereit sind. Zieht man die Maden unter konstanten Bedingungen (Temperatur, Dauerlicht) auf, würden die Fliegen so schlüpfen, wie es die rote Kurve andeutet: Anfangs sind noch keine Fliegen zum Schlüpfen bereit, nach einigen Tagen schlüpfen sehr viele, dann nimmt das Schlüpfen ab, bis alle Tiere geschlüpft sind. Aber es gibt kein rhythmisches Schlüpfen. Verändert nach Maier (1973) und Winfree (1988)

einer grossen Zahl von schlüpfenden Fliegen zu erkennen ist. Die einzelne Fliege schlüpft ja nur einmal in ihrem Leben aus dem Puparium. Da aber das Schlüpfen jeder Fliege durch eine innere Tagesuhr auf ein bestimmtes Zeitfenster des Tages beschränkt wird, kann man den Rhythmus erkennen.

Dass eine *innere Uhr* das Schlüpfen kontrolliert und nicht einfach nur der Licht-Dunkel-Wechsel, erkennt man am Schlüpfen von Tieren, die im Dunklen gehalten werden: Es erfolgt weiterhin tagesrhythmisch. Diese Uhr lässt sich durch Licht synchronisieren. Es sorgt dafür, dass die Fliegen zur richtigen Tageszeit aus der Puppenhülle schlüpfen.

2.1 Phasenresponse-Kurven

Mit Licht kann der Rhythmus verschoben werden. Es genügt dazu ein einziger kurzer Lichtpuls. Je nach dem Zeit-

punkt, zu dem er die Puppen trifft, verschiebt er den Rhythmus zu früheren oder späteren Zeiten. In Abbildung 2.3 ist eine Serie von Lichtpuls-Versuchen dargestellt. Jede Gruppe von Puppen wurde einmal für 10 Minuten belichtet, aber jeweils 3 Stunden später als die vorherige Gruppe. Es zeigt sich, dass der Schlüpfrythmus der belichteten Tiere weiterhin den gleichen Takt hat, nämlich etwa 24 Stunden zwischen den Schlüpfmaxima. Aber der Rhythmus hat sich in den meisten Fällen gegenüber der nicht belichteten Kontrollgruppe entweder verspätet oder verfrüht. Das hängt vom Zeitpunkt ab, zu dem belichtet wurde. Tiere, die *vor* ihrem 'Mitternachtspunkt' belichtet wurden, zeigen einen verspäteten Rhythmus. Licht *nach* dem Mitternachtspunkt verfrüht den Rhythmus. Die Verschiebungen sind bei 10 Minuten Belichtung recht kräftig.

Belichtet man die Puppen-Gruppen dagegen nur für 1 Sekunde, sind die Verschie-

2.1 Phasenresponse-Kurven

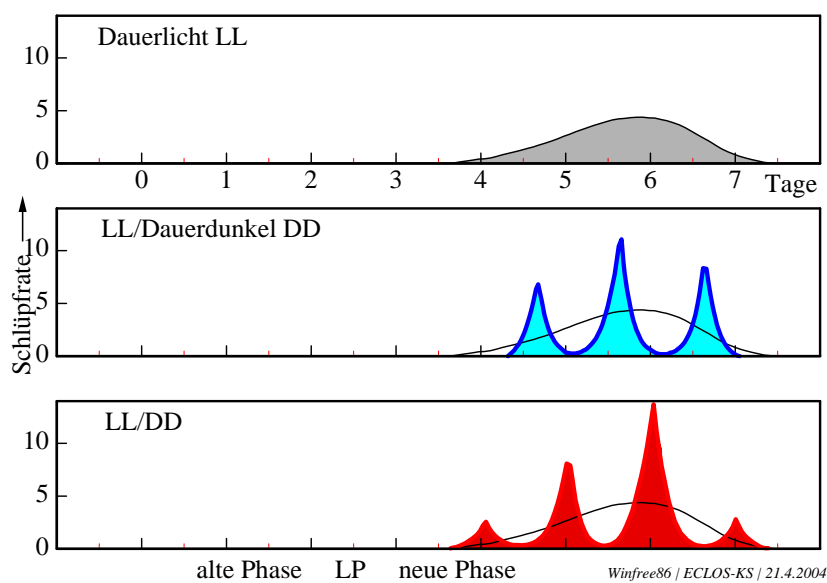


Abbildung 2.3: Unter Dauerlicht schlüpfen *Drosophila*-Fliegen nicht rhythmisch. Stattdessen bestimmt der Entwicklungszustand der Fliegen, ob und wann sie schlüpfen (oben). Wird eine Population von Puppen aus Dauerlicht in Sauerdunkel übertragen, beginnt eine circadiane Uhr zu laufen, die das Schlüpfen auf bestimmte tägliche Fenster beschränkt (Mitte, blau). Wird die circadiane Uhr durch einen Lichtpuls (LP) verschoben, verschiebt sich auch der Schlüpfrythmus der Fliegen (unten, rot)

2 Schlüpfrythmus von *Drosophila* und Arrhythmie

bungen des Rhythmus sehr viel geringer. Auch hier wird der Rhythmus von einem Lichtpuls verspätet, der vor dem Mitternachtspunkt gegeben wurde, und vorfrüht, wenn das Licht nach dem Mitternachtspunkt kam. Aber um die Zeit des Mitternachtspunktes herum gibt es jetzt kaum Verschiebungen, während zu diesem Zeitpunkt bei dem längeren Lichtpuls die stärksten Verschiebungen auftraten.

Man nennt diese Kurven Phasenresponse-Kurven und spricht von starken (10 Minuten-Lichtpuls) und schwachen (1 Sekunde Lichtpuls) Phasenresponsekurven. Wenn man die Ergebnisse so aufträgt, wie wir es bei den Herzschlag-Untersuchungen mit elektrischen Reizen getan hatten, ergeben sich Bilder, wie sie in Abbildung 2.4 zu sehen sind. Jetzt liegen die 'Schläge' (hier: Schlüpfmaxima) bei einer starken Reaktion auf Lichtpulse auf insgesamt horizontal und bei schwachen Reaktionen auf insgesamt diagonal verlaufenden Kurven.

Im Labor von Pittendrigh an der Princeton-Universität (Princeton, New Jersey) wurde der Schlüpfrythmus von *Drosophila pseudoobscura* sehr intensiv untersucht. Auch die Verschiebung durch Lichtpulse war ein wichtiges Instrument, um die Eigenschaften des tagesperiodischen Oszillators besser zu verstehen. Arthur Winfree hatte Ingenieurwissenschaften studiert und war deshalb mit mathematischen Verfahren vertraut, mit denen man Rhythmen untersuchen kann. Dazu gehört auch die Topologie, die wir bereits in Kapitel 1 kennenlernten. Ihm war aufgefallen, dass die Phasenresponse-Kurven schwacher oder starker Art sein konnten und wußte daher, daß es auch 'weisse Löcher' geben mußte. Wird das schwingende System durch eine gezielte Störung in diesen singulären Zustand gebracht, sollte der Rhythmus verschwinden. Aber wie findet

man diesen singulären Punkt am besten?

2.2 Wie man ein weisses Loch findet

Voraussetzung für ein weisses Loch ist, daß Störungen sowohl schwache als auch starke PRCs bewirken, wenn sie zu verschiedenen Phasen des Tagesrhythmus gegeben werden. Das ist der Fall, wie wir im Abschnitt 2.1 gesehen hatten. Nun ist die Suche nach solch einem singulären Punkt etwa so, wie wenn man nach einer Stecknadel im Heuhaufen sucht. Aber es gibt einen Trick, der hilft, ihn relativ schnell zu finden. Auch hier hilft die Topologie. Im Prinzip geht es darum, den Zeitpunkt zu finden, zu dem ein starker Lichtpuls am stärksten verschiebt, und eine Lichtstärke zu finden, die gerade eben noch keine schwache Reaktion mehr bewirkt, aber auch noch keine starke Reaktion hervorbringt. In Abbildung 2.5 ist gezeigt, wie man dabei am besten vorgeht. Es ist die schnellste Art, um den Singularitätspunkt zu finden. Einzelheiten sind aus der Abbildung und Legende zu entnehmen.

2.3 Wie man den Schlüpfrythmus mit einer Zeitmaschine messen kann

Obwohl der im vorigen Abschnitt geschilderte Trick das Suchen des weissen Loches stark vereinfacht, braucht man trotzdem noch eine ganze Reihe von Versuchen, um es auch zu finden. Deshalb hat Arthur Winfree eine Zeitmaschine gebaut, mit der man den Schlüpfrythmus der Fliegen automatisch messen kann, nachdem die verschiedenen Gruppen zu verschiedenen Zeiten mit unterschiedlich

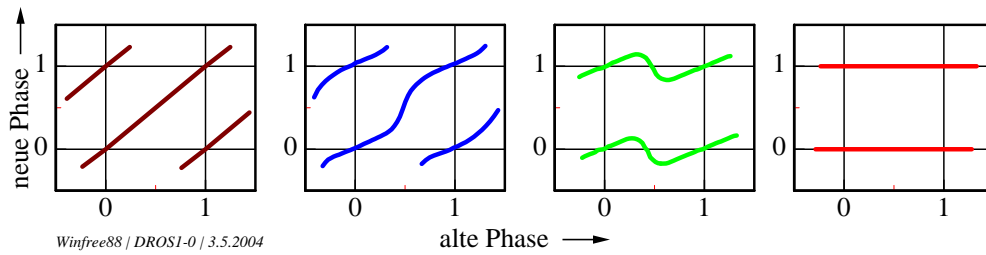


Abbildung 2.4: Starke und schwache Phasenresponsekurven auf Licht wurden so aufgetragen, dass der Zeitpunkt des Lichtpulses im Zyklus (von 0 bis 1) horizontal, die neue Phase nach dem Lichtpuls nach oben aufgetragen wurde. Wird kein Lichtpuls gegeben, liegen die Schläge wie erwartet auf den Diagonalen (linkes Diagramm). Neue und alte Phase sind gleich. Ist der Lichtpuls sehr stark, liegen die Schläge nach dem Reiz alle zur gleichen neuen Phase, unabhängig davon, wann belichtet wurde (rechtes Diagramm). Die blauen diagonal verlaufenden Kurven im zweiten Diagramm entsprechen einer schwachen Phasenresponsekurve, die grünen waagerechte verlaufenden einer starken (drittes Diagramm von links). Nach Winfree (1983)

starken Lichtpuls belichtet worden waren (Abbildung 2.6). Mit ihr konnte er mit der gerade besprochenen Strategie (Abschnitt 2.2) tatsächlich eine Kombination von Lichtdauer und Belichtungszeitpunkt finden, nach der der Schlüpfrythmus verschwand. Abbildung 2.7 zeigt ein Beispiel, in dem nach der kritischen Belichtung die Tiere nicht mehr rhythmisch schlüpfen.

2.4 Singuläres Schlüpfen

Die Zeitmaschine hatte gezeigt, dass der Schlüpfrythmus ausgelöscht werden kann, wenn ein spezieller Reiz zum richtigen Zeitpunkt gegeben wird. Aber handelt es sich dabei wirklich um Arrhythmie? Es könnte ja auch sein, daß durch diesen speziellen Puls die Rhythmen der verschiedenen Einzelfliegen in ganz verschiedene Phasen verschoben werden. Die einzelnen Uhren würden dann durchaus weiterlaufen, aber nicht mehr im gleichen Takt. Wie kann man das testen?

Dabei hilft die besondere Art der PRC

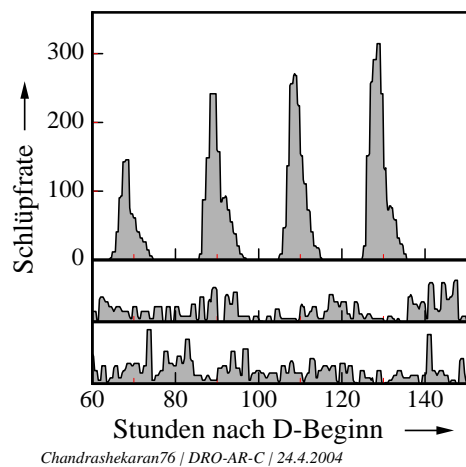


Abbildung 2.7: Ein blauer Lichtpuls einer bestimmten Dauer zu einem kritischen Zeitpunkt innerhalb des Tageszyklus gegeben führt zum Verlust des Schlüpfrythmus (mittlere und untere Kurve). Die Fliegen schlüpfen zufallsverteilt. Die untere Kurve zeigt eine Kontrolle, die nicht belichtet wurde.

2 Schlüpfrythmus von Drosophila und Arrhythmie

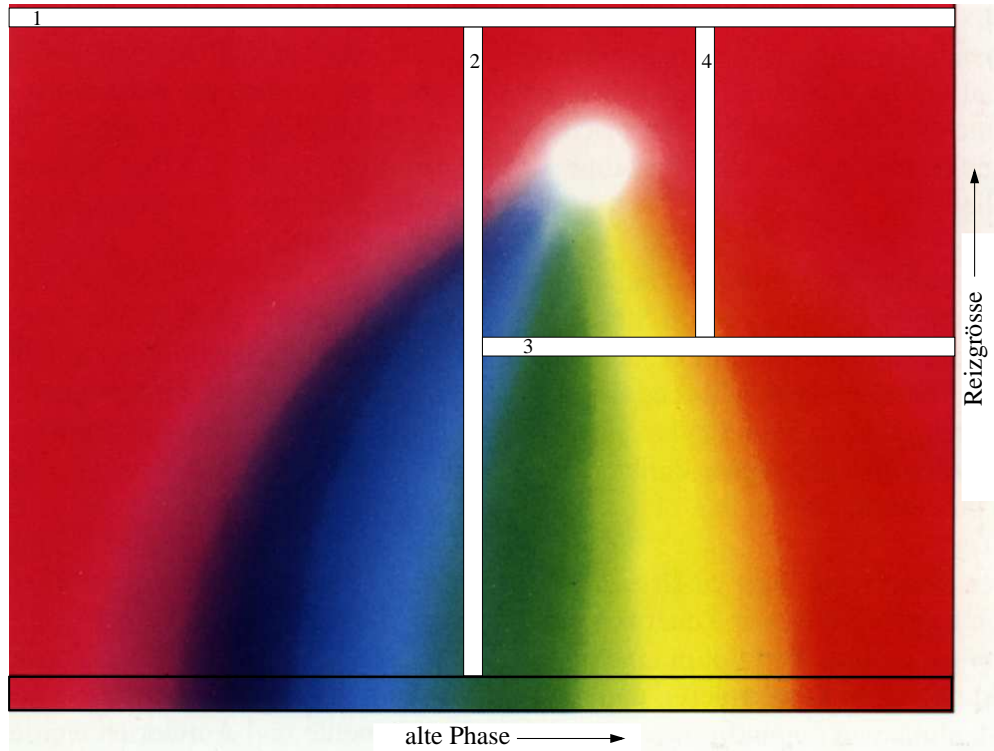


Abbildung 2.5: Die schnellste Art, ein weisses Loch experimentell zu finden: Wir tragen die Reizgröße gegen die Phase auf, zu der der Reiz geboten wird. Als erstes geben wir einen möglichst starken Reiz zu den verschiedenen Phasen (Streifen 1). Wenn sich in allen Fällen die gleiche neue Phase (hier rot) ergibt, haben wir eine starke Reaktion des Rhythmus auf den Reiz. Als nächstes wird in der Mitte zwischen zwei Schlüpfmaxima ein Reiz gegeben, dessen Stärke für die verschiedenen Gruppen von schwach zu stark variiert wird (Streifen 2). Die Farben unmittelbar neben dem Streifen 2 geben an, in welche neue Phase der Reiz den Rhythmus versetzt hat. Da im linken Rechteck die Ränder keinen vollen Durchgang durch das Farbspektrum zeigen (sondern nur von blau auf rot wechseln), muss der farblose Punkt im rechten Rechteck liegen. Wir geben jetzt Reize mit der halben Stärke zu den Phasen rechts von der Mitte der alten Phase (Streifen 3). Der untere Teil hat an seinen Rändern keine geschlossene Farbskala. Das weisse Loch muss also im oberen Teil liegen. Deshalb wird im nächsten Experiment zur alten Phase 0.75 (also bei $3/4$ der x-Achse) die Reizstärke von $1/2$ bis 1 (volle Stärke, Streifen 4) variiert. Der rechte Teil des Rechtecks hat um seine Ränder herum die gleiche neue Phase (rot), enthält also nicht das weisse Loch. Es muss im linken Teil des Rechtecks liegen und kann jetzt durch ein paar weitere Versuche genauer bestimmt werden.

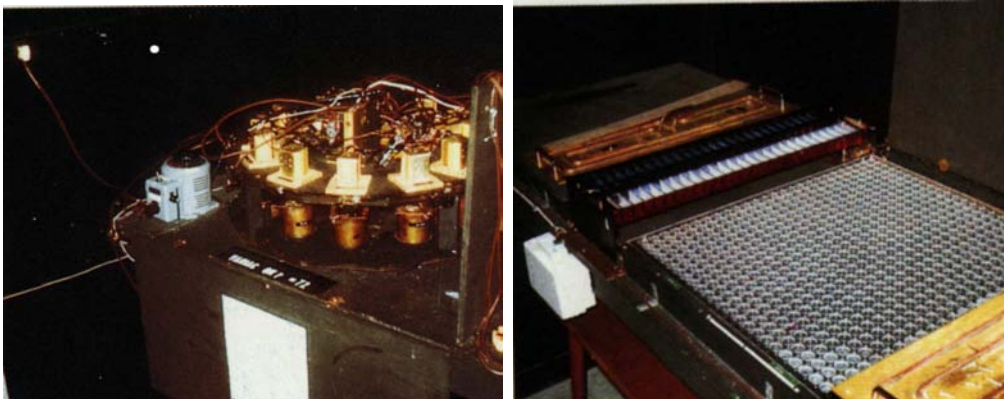


Abbildung 2.6: Rechts: Zeitmaschine von Arthur Winfree für das Schlüpfen von Fruchtfliegen. Ein länglicher Trog enthält 26 getrennte Abteilungen, die vom Experimentator mit verschiedenen Gruppen von Puppen beschickt werden. Zum Beispiel könnten 24 Gruppen jeweils um eine Stunde zeitverschoben benutzt werden und die beiden Aussen-Abteilungen unbelichtete Puppen als Kontrollen enthalten. Unter jeder Abteilung befindet sich ein Teflon-behandelter Trichter, auf dem geschlüpfte Fliegen sich nicht halten können und deshalb durch die Trichteröffnung in eine Wasser-gefüllte Vertiefung fallen. 24 solcher Plexiglas-Streifen mit Vertiefungen liegen nebeneinander und werden stündlich weitergeschoben, sodass die geschlüpfte Fliegen später für einen ganzen Tag gezählt werden können. Neue Platten mit Vertiefungen werden für den nächsten Tag eingelegt. Mit dieser Apparatur können also für mehrere Tage die zu den verschiedenen Tagesstunden geschlüpfte Tiere der verschiedenen behandelten Gruppen ausgezählt werden.

Links: Auch die Belichtung der Puppen kann automatisch erfolgen. Sie werden in zwölf verschiedenen Gruppen in Gefäße gebracht, auf die -abgeschirmt von den anderen Gruppen-, blaues Licht einer bestimmten Intensität und einer wählbaren Dauer zu bestimmten Phasen (12 pro Experiment wählbar) des Tagesrhythmus der Puppen gegeben wird. Beide Abbildungen aus Winfree (1988)

2 Schlüpfrythmus von *Drosophila* und Arrhythmie

von *Drosophila*. Sie zeigt über eine grosse Strecke der Tagphase hinweg keine Reaktion auf einen Lichtpuls (Abbildung 1.3, Totzone). Das ist ja auch sinnvoll, denn während der Tagphase herrscht ja Licht.

Wir müssen uns jetzt überlegen, was ein Lichtpuls machen würde, wenn er eine Population von Fliegen im Puparium trifft, die alle eine laufende Tagesuhr besitzen, die sich aber in allen möglichen Phasen des Tageszyklus befinden. Als Alternative hätten wir eine Population von Fliegenpuppen, die durch den speziellen Lichtpuls ihren Rhythmus verloren haben. Wenn diese einen erneuten Lichtpuls bekommen, wird in allen Puppen der Rhythmus neu angestoßen und man müsste einen klaren eingipfligen Tagesrhythmus erhalten. Wenn dagegen die Uhren durcheinander gehen, würde der Lichtpuls einen grossen Teil der Puppen in den Phasen treffen, die in der Totzone liegen. Es gibt dann keine Phasenverschiebung. Es würden auch mehr Puppen mit ihrer Uhr in einem Bereich sein, in dem das Licht maximal verschiebt. Dazwischen sind dann die Bereiche, in denen die PRC ihre steilen Teile hat. Sie kommen aber seltener vor als die vorher erwähnten Bereiche. Das Ergebnis eines zweiten Lichtpulses, der die nicht mehr synchronisierten, aber noch laufenden Oszillatoren trifft, ist eine zweigipflige Kurve (Abbildung 2.8).

Das lässt sich nun experimentell prüfen. Arrhythmisches Schlüpfen kann man erhalten, wenn die Tiere zum Beispiel einige Tage in Dauerlicht gehalten werden. Werden sie nun in Dunkelheit gebracht und das Schlüpfen registriert, gibt es einen Gipfel pro Tag. Desynchrone Kulturen können wir herstellen, indem wir Gruppen von Tieren aus dem Dauerlicht zu verschiedenen Zeiten in Dauerdunkel bringen und sie dann vermischen. Alle Tiere haben dann laufende Uhren,

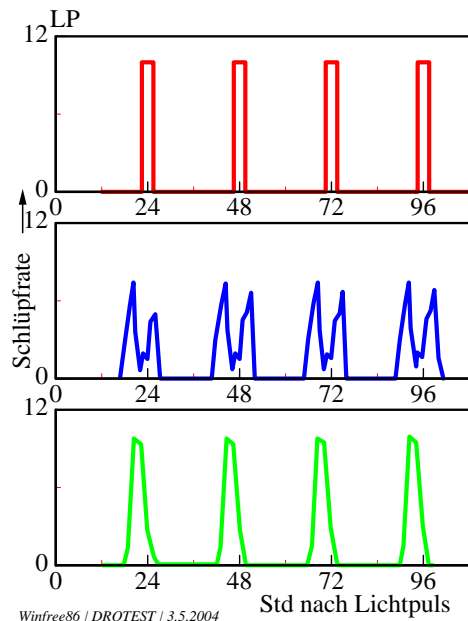


Abbildung 2.8: Mit einem zweiten Lichtpuls nach einem singulären Puls kann getestet werden, ob dieser die Fliegen arrhythmisch gemacht oder sie desynchronisiert hat, sodass jede Fliege zwar noch einen Rhythmus hat, der aber je nach Fliege eine ganz verschiedene Phasenlage hat. Im ersten Fall (Arrhythmie) bewirkt der zweite Puls einen neuen Rhythmus des Schlüpfens mit nur einem Maximum pro Tag. Im zweiten Fall führt er zu einem zweigipfligen Schlüpfen. Die beiden theoretischen Ergebnisse sind in den oberen Kurven gezeigt, das Experiment ergibt die untere Kurve. Sie spricht für Arrhythmie der einzelnen Fliegen.

2.6 Ist ein langer schwacher Reiz wie ein kurzer starker?

aber sie sind nicht im Takt miteinander. Wenn wir dieser Mischpopulation einen Lichtpuls geben, erhalten wir eine zweigipflige Schlüpfkurve pro Tag. Das hatten wir ja auch aus den Überlegungen des vorigen Abschnittes erwartet. Nun kommt das entscheidende Experiment. Wir testen die Population, die mit einem singulären Lichtpuls behandelt worden war, mit einem zweiten Lichtpuls. Er bewirkt tatsächlich ein eingipfliges Schlüpfen. Die spezielle Behandlung mit einem singulären Lichtpuls hat also tatsächlich den Rhythmus ausgelöscht und nicht etwa die Uhren in verschiedene Phasen geschoben.

2.5 Singuläre Bedingungen in aufeinander folgenden Zyklen

Wenn man die Belichtungen, die im ersten Zyklus nach Übergang in Dauerdunkel Arrhythmie erzeugen, erst im zweiten oder dritten Zyklus gibt, genügt eine geringere Intensität, um den Rhythmus auszulöschen. Mit den gleichen Belichtungsstärken wie im ersten Zyklus wird in den Folgezyklen der Rhythmus verschoben und nicht ausgelöscht. Wie lässt sich das erklären?

Am wahrscheinlichsten ist, dass es sich hierbei nicht um Unterschiede im Uhrwerk handelt. Vielmehr dürften die Lichtrezeptoren bei längeren Dunkelperioden empfindlicher werden. Es genügt dann weniger Licht, um ein Signal zu erzeugen, welches die Uhr zum Stoppen bringt. In Abbildung 2.9 ist dargestellt, wie die Belichtung im ersten, zweiten und dritten Zyklus sein muss, um Arrhythmie zu erzeugen.

2.6 Ist ein langer schwacher Reiz wie ein kurzer starker?

Bei Lichtreaktionen ist oft das Produkt aus Lichtintensität und Dauer der Belichtung für die Effekte verantwortlich. Man kann also einen schwachen langen oder kurzen starken Lichtpuls verwenden, um das gleiche zu bewirken. Gilt das auch für den speziellen Lichtpuls, der den Schlüpf-rhythmus von *Drosophila* arrhythmisch macht?

Um die Schlüpfuhr zu stoppen, wird normalerweise ein Puls blauen Lichtes von 50 Sekunden Dauer und einer Beleuchtungsstärke von $10\mu Wcm^{-2}$ verwendet. Das Produkt betrug also $500\mu Wcm^{-2}sek$. Es wurden nun Versuche gemacht, bei denen das Produkt aus Dauer und Intensität den gleichen Wert ergab (Abbildung 2.10). Erstaunlicherweise kann man tatsächlich in einem sehr weiten Bereich Arrhythmie erzeugen. So hat selbst ein Puls von 50000 Sekunden (etwa 13.9 Stunden) Dauer noch diesen speziellen Rhythmus-löschenden Effekt, wenn das Produkt dem des Standardpulses entspricht ($0.01\mu Wcm^{-2}$, Chandrashekar and Engelmann (1976)). Im anderen Extrem kann ein nur 0.04 Sekunden langer Puls mit entsprechend hoher Intensität ($12500\mu Wcm^{-2}$) zu Arrhythmie führen (Abbildung 2.11). In allen Fällen musste der Puls zur kritischen Phase *beginnen*.

2.7 Mit singulärem Puls testen, wie Temperatur auf die Uhr wirkt

Mit einem singulären Puls lässt sich die Wirkung von Temperatur auf die Schlüpf-Uhr von *Drosophila* testen (Hamm et al. (1975)). Der singuläre Reiz muss bei

2 Schlüpfrythmus von Drosophila und Arrhythmie

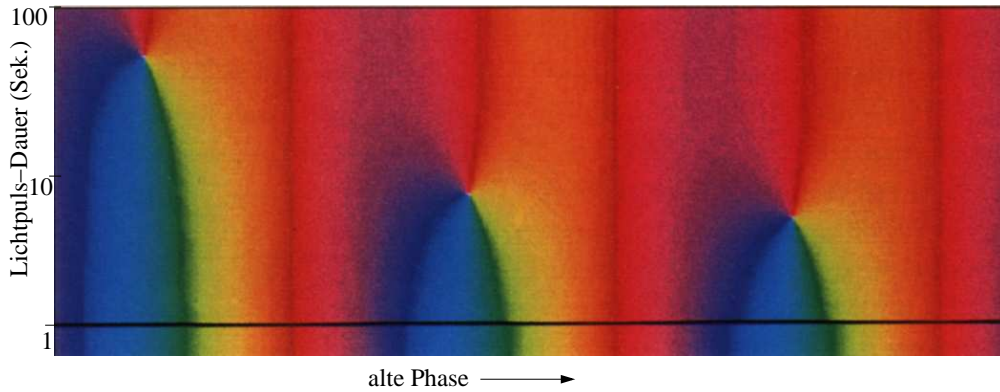


Abbildung 2.9: Wird der weisse Punkt nicht nur im ersten Zyklus nach Beginn des Dauerdunkels bestimmt, sondern auch am zweiten und dritten Tag, ergeben sich unterschiedliche Bedingungen: An den Folgetagen ist ein kürzerer Lichtpuls nötig, um Arrhythmie zu induzieren. Vermutlich sind die Lichtrezeptoren nach längerer Dunkelperiode auf Licht empfindlicher als am ersten Tag.

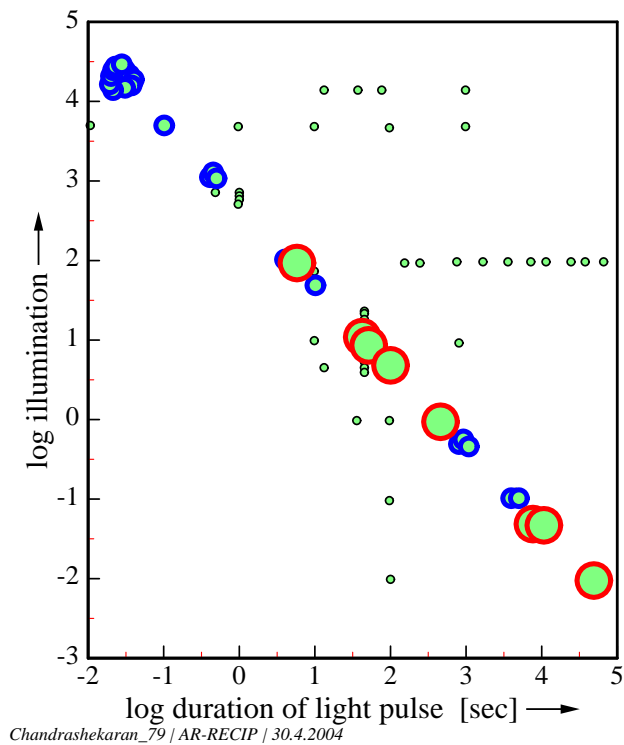


Abbildung 2.11: Um den Schlüpfrythmus auszulöschen, muss das Produkt aus Belichtungsdauer (x-Achse) und -stärke (y-Achse) einen bestimmten Wert haben. Die Stärke der Arrhythmie ist durch die unterschiedlichen grossen Kreise und Farben wiedergegeben. Rot umrandet und gross: Starke Arrhythmie (R-Wert über 100), blau umrandet und mittelgross: ziemlich arrhythmisch (R-Wert zwischen 50 und 100). Grün und klein: (R-Wert unter 50). Beispiele sind in Abbildung 2.10 gegeben. Nach Chandrashekarar and Engelmann (1976)

2.7 Mit singulärem Puls testen, wie Temperatur auf die Uhr wirkt

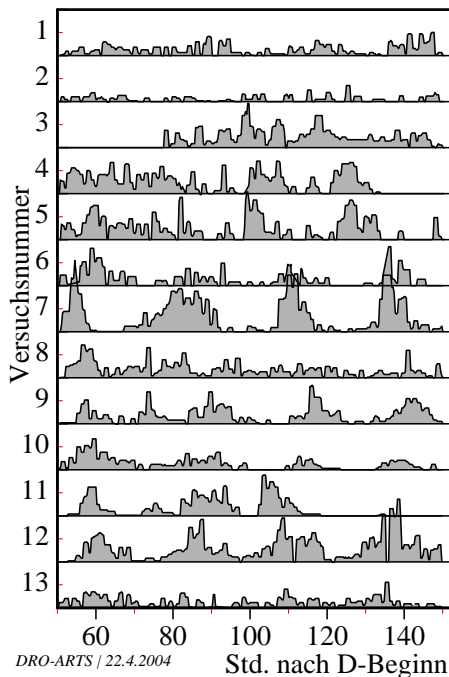


Abbildung 2.10: Um den Schlüpfrythmus auszulöschen, muss das Produkt aus Lichtdauer und -intensität einen bestimmten Wert haben. Hier wurden folgende Kombinationen ausprobiert (Versuchsnummer steht links vor den Kurven): 1: 50000 Sekunden mit $0.01\mu Wcm^{-2}$, 2: 10000 Sekunden mit $0.05\mu Wcm^{-2}$, 3: 5000 Sekunden mit $0.1\mu Wcm^{-2}$, 4: 1000 Sekunden mit $0.5\mu Wcm^{-2}$, 5: 500 Sekunden mit $1\mu Wcm^{-2}$, 6: 100 Sekunden mit $5\mu Wcm^{-2}$, 7: 50 Sekunden mit $10\mu Wcm^{-2}$, 8: 10 Sekunden mit $50\mu Wcm^{-2}$, 9: 5 Sekunden mit $100\mu Wcm^{-2}$, 10: 1 Sekunden mit $500\mu Wcm^{-2}$, 11: 0.5 Sekunden mit $1000\mu Wcm^{-2}$, 12: 0.1 Sekunden mit $5000\mu Wcm^{-2}$, 13: 0.04 Sekunden mit $12500\mu Wcm^{-2}$. Die Stärke der Arrhythmie ist in Abbildung 2.11 dargestellt. Nach Chandrashekar and Engelmann (1976)

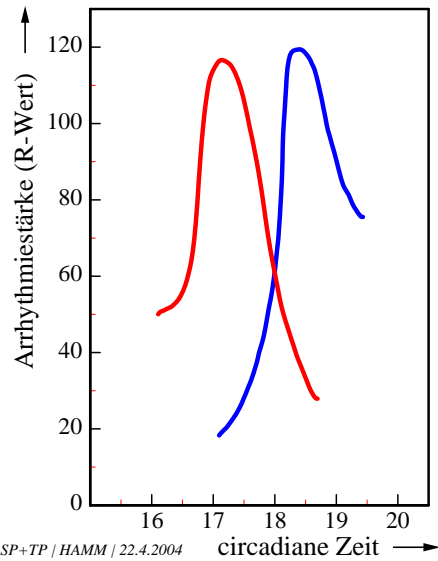


Abbildung 2.12: Ein singulärer Lichtpuls muss bei einer tieferen Temperatur ($6^{\circ}C$) 1.5 bis 2 Stunden früher gegeben werden (rote Kurve) als bei der normalen $20^{\circ}C$ -Temperatur (blau) (Hamm et al. (1975))

$20^{\circ}C$ zur circadianen Zeit 18.5 (6.5 Stunden nach Ende der letzten Lichtperiode) gegeben werden und bewirkt dann starke Dämpfung des Schlüpfrythmus (blaue Kurve in Abbildung 2.12). Wird aber während der Belichtung die Temperatur auf $6^{\circ}C$ abgesenkt (symmetrisch zur 10 Sekunden-Belichtung), schlüpfen die Tiere rhythmisch. Um starke Dämpfung zu erhalten, muss bei $6^{\circ}C$ der kritische Lichtpuls 1.5 bis 2 Stunden früher gegeben werden (rote Kurve in der Abbildung 2.12).

2 *Schlüpfrythmus von Drosophila und Arrhythmie*

3 Blumenuhr *Kalanchoe*

Der Nachteil des Schlüpfrythmus von *Drosophila*-Fliegen aus dem Puparium ist, das es sich dabei um einen Populationsseffekt handelt. Jede Fliege schlüpft nur einmal, und man braucht deshalb sehr viele schlüpfende Fliegen, um den Rhythmus überhaupt sehen zu können.

3.1 Blütenblattbewegung von *Kalanchoe*

Deshalb war ein anderer tagesperiodischer Vorgang interessant, bei dem der Rhythmus an einem Organ für längere Zeit direkt beobachtet werden kann. Es handelt sich um die tagesperiodische Bewegung der Blütenblätter von *Kalanchoe blossfeldiana*. Dieses Dickblattgewächs hat im Herbst und Winter zahlreiche kleine rote Blüten, die ihre vier Blütenzipfel am Tage öffnen und in der Nacht zusammenfallen (siehe Abbildung 3.1 und Engelmann (2003a)). Das geschieht auch an abgeschnittenen Blüten, die in einem Loch einer Plexiglasscheibe auf einem Zuckerwasser-gefüllten Gefäß stecken (Abbildung 3.2). Und die Blüten bewegen sich auch tagesperiodisch, wenn statt eines Licht-Dunkel-Wechsels dauernd schwaches Grünlicht brennt. Für die Blüten ist dieses Licht wie Dunkelheit, und sie können sich bis zu vierzehn Tage noch tagesperiodisch bewegen. Allerdings ist die Uhr, die diese Bewegung steuert, schneller als 24 Stunden, nämlich etwa 22 bis 23 Stunden pro Schwingung (Abbildung 3.3).

Die Bewegung läßt sich registrieren, indem man mit einer Video-Kamera alle

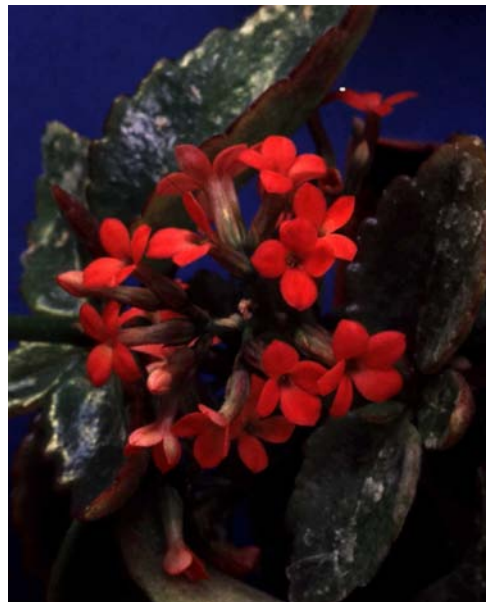


Abbildung 3.1: Blühende *Kalanchoe*-Pflanze. Die kleinen Blüten öffnen und schliessen ihre Blütenblätter tagesperiodisch

3 Blumenuhr Kalanchoe

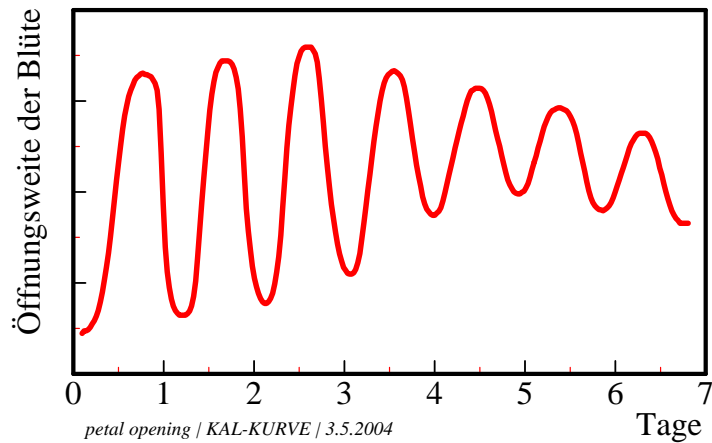


Abbildung 3.3: *Kalanchoe*-Blüten öffnen und schliessen sich auch unter konstanten Bedingungen (schwaches Grünlicht, konstante Temperatur). Die Periodenlänge der Schwingungen beträgt 22 bis 23 Stunden.

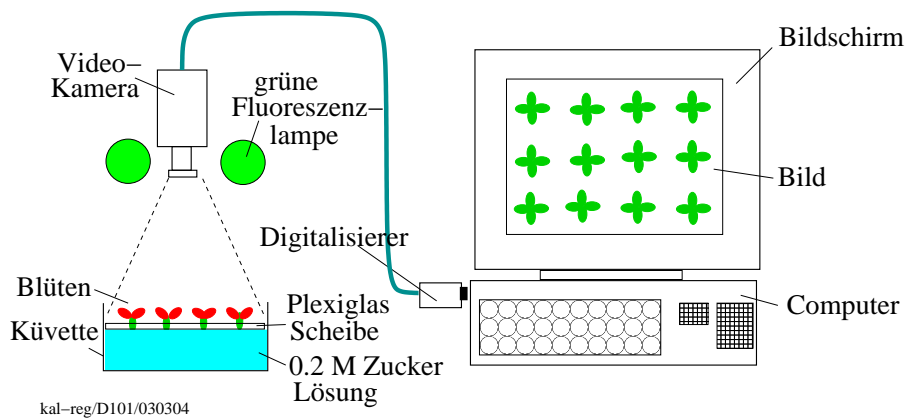


Abbildung 3.4: Die Blütenblattbewegung lässt sich mit einer Video-Kamera und einem Bildanalyse-Programm messen und auswerten. Es können viele Blüten gleichzeitig gemessen werden.

3.1 Blütenblattbewegung von Kalanchoe

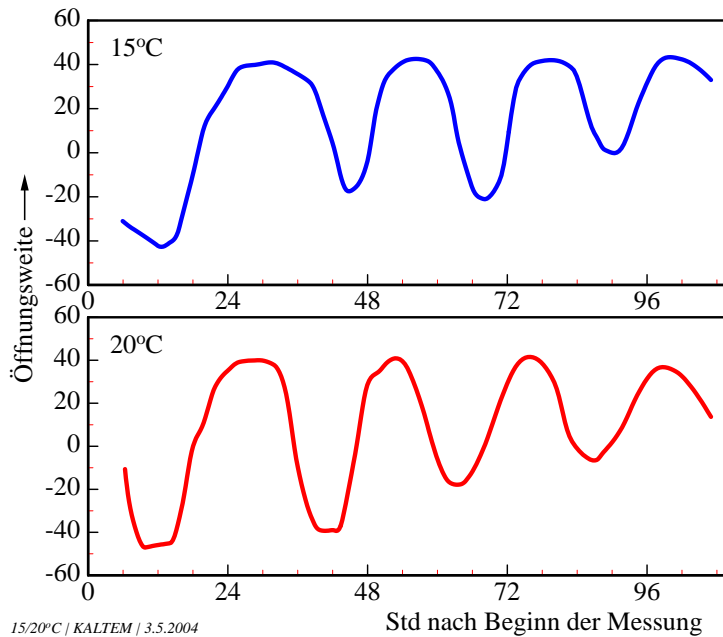


Abbildung 3.5: Beispiele für Kurven der Blütenblattbewegung einzelner *Kalanchoe*-Blüten unter konstanten Bedingungen von Temperatur (oben: 15°C, unten: 20°C) und schwachem Grünlicht

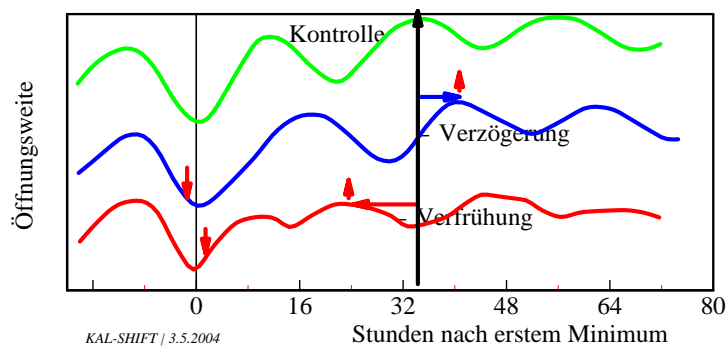


Abbildung 3.6: Die *Kalanchoe*-Blütenblattbewegung wurde durch einen Lichtpuls (rote Pfeile nach unten) vor (blaue Kurve in der Mitte) und nach (rote Kurve unten) maximalem Schliessen der Blüten (0 auf der x-Achse) Phasen-verschoben. Der Rhythmus wird dadurch verzögert (Mitte, blauer waagerechter Pfeil) beziehungsweise verfrüht (unten, roter waagerechter Pfeil). Der grosse senkrechte schwarze Pfeil zeigt die Lage des Maximums der Kontrollkurve (grün)

3 Blumenuhr Kalanchoe



Abbildung 3.2: Werden einzelne Blüten von der Pflanze abgeschnitten und in Löcher einer Plexiglas-Scheibe gesteckt, die auf einer Zuckerlösung schwimmt, bewegen sich die Blütenblätter weiterhin tagesperiodisch. Dem Wasser kann man Substanzen beimischen und prüfen, ob durch sie der Rhythmus beeinflusst wird.

Stunde die Blüten von oben fotografiert (Abbildung 3.4). Mit einem Bildanalyse-Programm kann nun die Grösse der Blüten bestimmt werden. Sind die Blüten geschlossen, sind sie klein; geöffnete Blüten sind wesentlich grösser. Die Werte können für jede Blüte in einer Datei gespeichert und als Diagramm gegen die Zeit aufgetragen werden (Abbildung 3.3). Es ergeben sich sehr gleichmässige harmonische Schwingungen, die ohne Glättung und andere Verfahren direkt analysiert werden können. Die Schwingungsweite, Periodenlänge und Phasenlage der Kurven können benutzt werden, um die Schwingungen zu charakterisieren. Wie beim Schlüpfrythmus von *Drosophila* wird auch bei den *Kalanchoe*-Blüten die Periodenlänge nur wenig durch Temperatur beeinflusst (siehe Abbildung 3.5). Lichtpulse verschieben den Rhythmus (siehe Abbildung 3.6). Schwache Lichtpulse ergeben schwache, starke Lichtpulse starke Phasenresponsekurven.

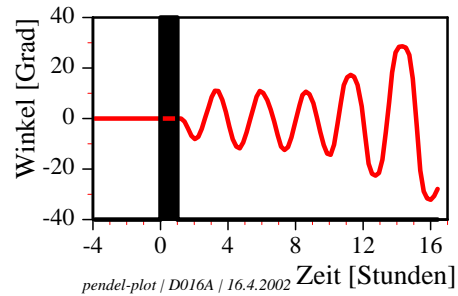


Abbildung 3.8: Periodische Pendelbewegungen von Sonnenblumenkeimlingen nach einer 20-minütigen (Markierung) Schwerkraftreizung

3.2 Oszillatormodell von Johnsson und Karlsson: gravitropes Pendel

Zwei schwedische Physiker von der Universität in Lund hatten die durch die Schwerkraft induzierten Pendelbewegungen von Sonnenblumenkeimlingen untersucht und ein Modell vorgeschlagen, mit dem diese Schwingungen beschrieben werden konnten. Abbildung 3.7 zeigt, wie ein etwa 6 cm hoher Keimling sich zur Seite krümmt, wenn er vorher für 20 Minuten mit seinem Topf auf die Seite gelegt wird. Nach einer gewissen Zeit krümmt er sich wieder zurück, schießt dabei aber über die Senkrechte hinaus und biegt sich dann zur Gegenseite. Er wird wieder durch die Schwerkraft gereizt und biegt sich wieder zurück, über die Senkrechte hinaus, um dann erneut zum Krümmen gereizt zu werden (Abbildung 3.8). Auf diese Weise entsteht eine Pendel-artige Bewegung. Je nach der Umgebungstemperatur sind die Periodenlängen der Schwingungen im Bereich von 125 Minuten (bei 25°C) bis 265 Minuten (bei 15°C). Verantwortlich für diese Krümmungen sind Reizungen durch Statolithen in den Zellen des Hypoko-

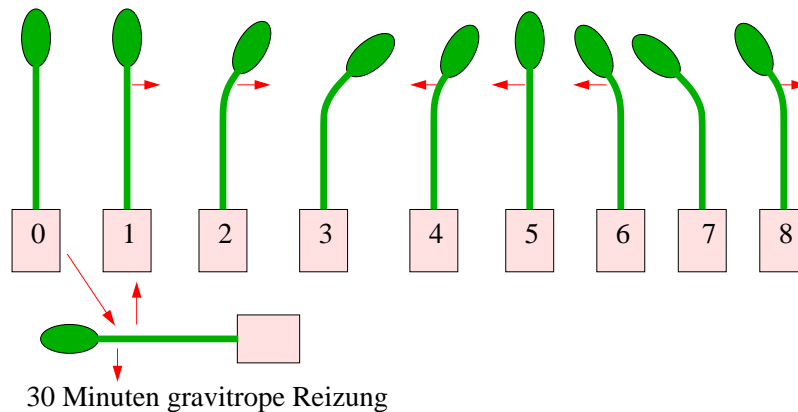


Abbildung 3.7: Ein Sonnenblumenkeimling wird für 30 Minuten waagrecht gelegt (0) und danach wieder senkrecht gestellt (1). Dadurch wird er von der Schwerkraft der Erde gereizt und beginnt nach sich dem Wiederaufrichten zu krümmen (2). Er krümmt sich noch weiter (3), bis im Zustand maximaler Krümmung der Unterschied der Hormonkonzentrationen der beiden Flanken verschwindet. Ein neuer gravitroper Reiz stimuliert das Hypokotyl neu. Es krümmt sich jetzt nach der anderen Seite (4), schießt über die Senkrechte hinaus (5) und biegt sich zur anderen Seite (6), bis ein neuer gravitroper Reiz entsteht (7), der zu einer Gegenreaktion führt (8). Es ergibt sich eine Pendelbewegung. Die roten horizontalen Pfeile zeigen die Richtung der Krümmung an. Nach Engelmann and Johnsson (1998)

tyls, die zu Verschiebungen von Wachstumshormonen führen (siehe Engelmann (2003c)).

Das Modell ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Es ist ein Rückkopplungskreis, bei dem ein Sollwert (senkrecht wachsen) mit einem Istwert (Krümmung der Pflanze) verglichen wird. Bei einer Abweichung von der Senkrechten wird ein Fehlersignal verstärkt, gewichtet und das Signal nach einer Zeitverzögerung wieder mit dem Sollwert verglichen. Wählt man die Parameter in geeigneter Weise, schwingt dieses System und ahmt recht gut die Pendelbewegungen des Sonnenblumenkeimlings nach. Man kann an diesem Modell auch untersuchen, was passiert, wenn ein zweiter Schwerkraftreiz zu verschiedenen Zeiten nach dem ersten Reiz geboten wird.

Als Anders Johnsson und Hage Karlsson von meinen Untersuchungen an den Kalanchoe-Blüten hörten, versuchten sie,

mit ihrem Rückkopplungsmodell auch diese Schwingungen zu beschreiben und waren damit sehr erfolgreich (Abbildung 3.10). Sie konnten auch die Wirkung von Temperatur- und Lichtpulsen simulieren. Wählten sie einen geeigneten Eingang der Störungen in den Rückkopplungskreis, wurden auch die von mir untersuchten Phasenresponsekurven an den Kalanchoe-Blüten gut modelliert.

3.3 Phasenresponsekurve und Arrhythmie

Wie beim rhythmischen Schlüpfen von *Drosophila*-Fliegen kann man auch bei den periodischen Öffnungsbewegungen der Kalanchoe-Blüten den Rhythmus durch Lichtpulse beeinflussen. Auch hier verschieben schwache Lichtpulse den Rhythmus nur wenig und starke Licht-

3 Blumenuhr Kalanchoe

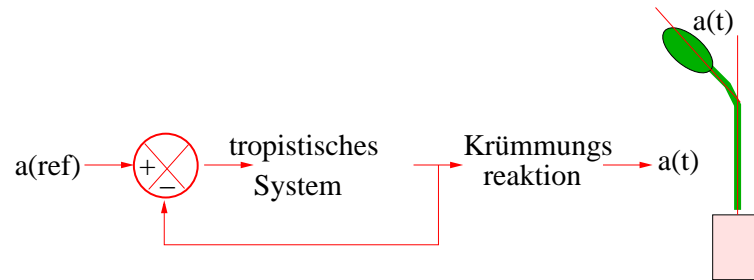


Abbildung 3.9: Rückkopplungsmodell der Pendelbewegung von Johnsson and Karlsson (1972) (siehe auch Karlsson and Johnsson (1972)). Ein Sollwert (senkrecht wachsen) wird mit einem Istwert (Krümmung der Pflanze) verglichen. Weicht die Richtung des Hypokotyls (Stängel unter den Keimblättern) von der Senkrechten ab, wird ein Fehlersignal im tropistischen System verstärkt, gewichtet und das Signal nach einer Zeitverzögerung wieder mit dem Sollwert verglichen (rote Rückkopplungsschleife). Wählt man die Parameter in geeigneter Weise, schwingt dieses System und ahmt recht gut die Pendelbewegungen des Sonnenblumenkeimlings nach.

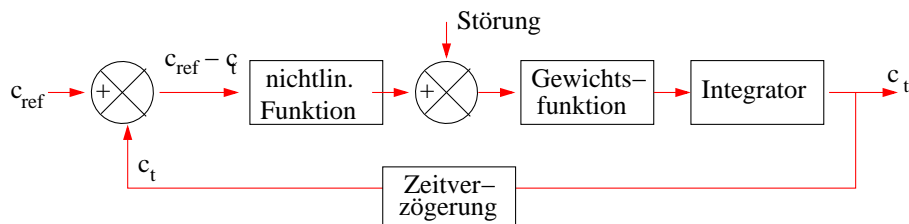


Abbildung 3.10: Rückkopplungsmodell für die Bewegung der Kalanchoe-Blütenblätter.

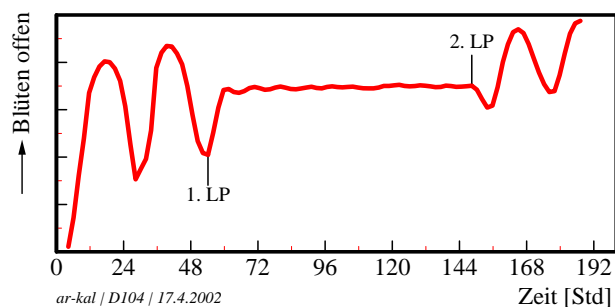


Abbildung 3.11: Ein spezieller Rotlicht-Puls von $230\mu W cm^{-2}$ und 130 Minuten Dauer macht *Kalanchoe*-Blüten arrhythmisch, wenn er 30 Stunden nach Beginn des Dauerdunkels gegeben wird

3.4 Der singuläre Punkt bei *Kalanchoe*

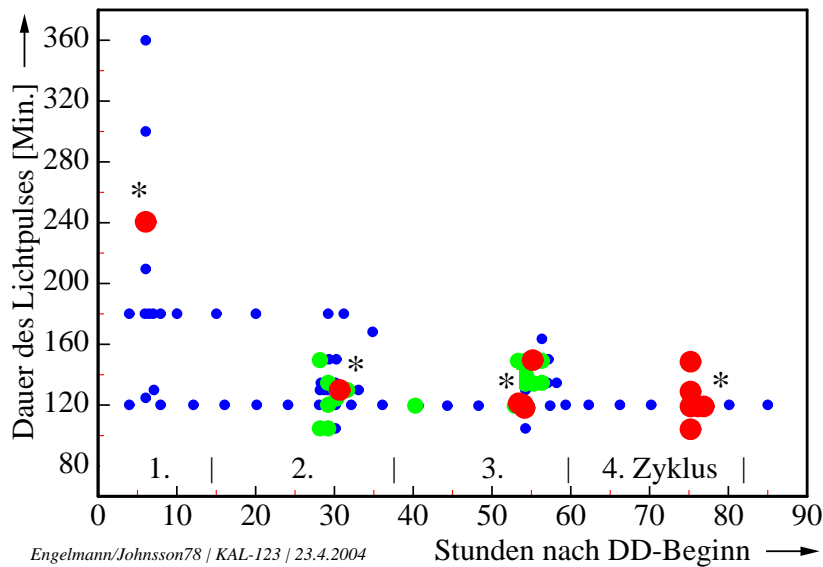


Abbildung 3.12: Um *Kalanchoe*-Blüten arrhythmisch zu machen, muss im ersten Zyklus nach Beginn des Dauerdunkels ein Lichtpuls gegeben werden, der doppelt so lang ist (240 Minuten) wie in den folgenden Zyklen (130 Minuten). Die Lage des weissen Loches (*) und Dauer des Lichtpulses (y-Achse), um Arrhythmie zu erzielen, sind angegeben

pulse ergeben starke Verschiebungen. Das bedeutet aber, dass man auch bei den *Kalanchoe*-Blüten Bedingungen finden kann, unter denen ein spezieller Lichtpuls zum richtigen Augenblick gegeben den Rhythmus auslöscht. Deshalb haben wir eine grössere Schar von Experimenten durchgeführt, bei denen die Belichtungsdauer variiert wurde und die Lichtpulse zu verschiedenen Phasen des Zyklus gegeben wurden. Tatsächlich haben wir auf diese Weise auch bei *Kalanchoe* einen Lichtpuls gefunden, der Arrhythmie induziert (Abbildung 3.11). Und wie bei *Drosophila* ist auch bei *Kalanchoe* im ersten Zyklus nach Beginn des Dauerdunkels ein längerer Lichtpuls nötig (4 Stunden) als in den folgenden Zyklen (2 Stunden), um die Schwingungen auszuschalten (Abbildung 3.13).

3.4 Der singuläre Punkt bei *Kalanchoe*

Jetzt können wir die Ergebnisse der Lichtpulse in der gleichen Art zusammentragen, wie es schon bei dem pinwheel-Experiment von *Drosophila* geschah. Wir tragen in einem dreidimensionalen Schema die alte Phase und Lichtstärke auf der x-y-Achse der Grundfläche auf und den Zeitpunkt des Maximums nach Beginn des Reizes (die neue Phase) auf der z-Achse nach oben (Abbildungn). Dieses Zeitkristall ergibt wie bei *Drosophila* eine Wendeltreppen-artige Struktur. Die Spindel entspricht den singulären Bedingungen, bei denen keine Schwingungen mehr auftreten.

Auch hier müssen wir uns fragen, ob die Zellen der Blüten, deren Schwellen und Schrumpfen für die Bewegung der Blütenzipfel verantwortlich ist, tatsächlich ar-

3 Blumenuhr Kalanchoe

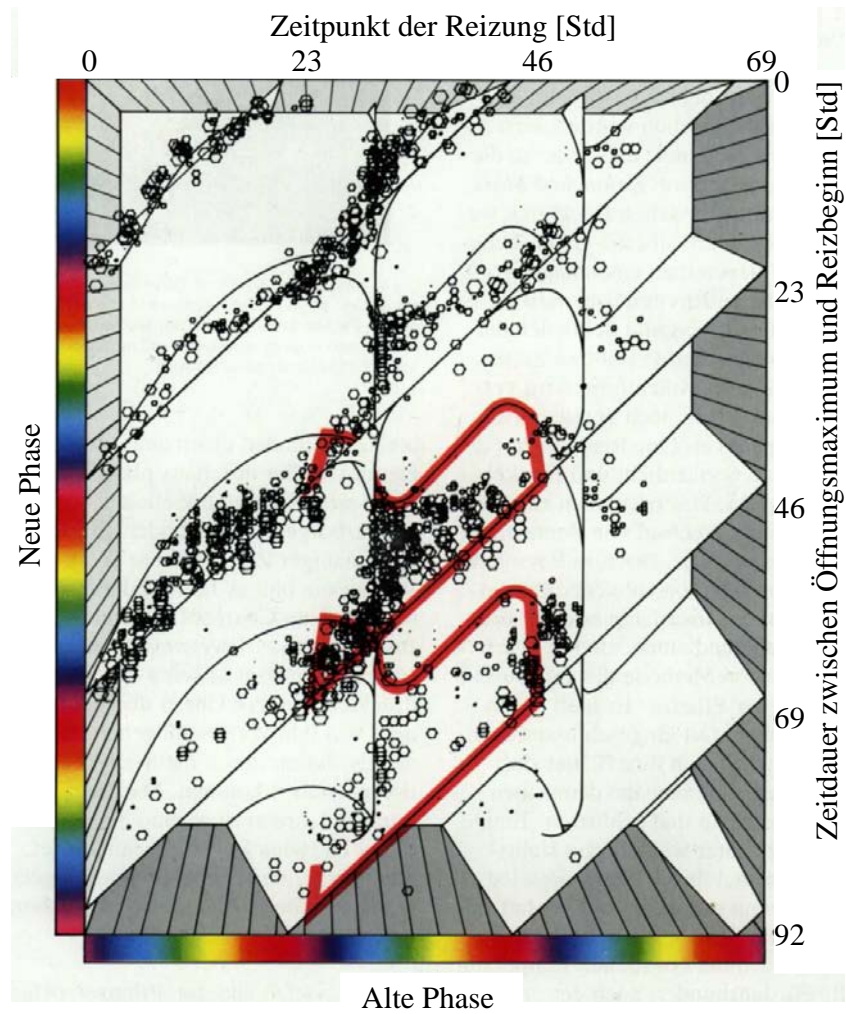


Abbildung 3.13: Um *Kalanchoe*-Blüten arrhythmisch zu machen, muss im ersten Zyklus nach Beginn des Dauerdunkels ein Lichtpuls gegeben werden, der doppelt so lang ist (240 Minuten) wie in den folgenden Zyklen (130 Minuten). Die Lage des weissen Loches (*) und Dauer des Lichtpulses (y-Achse), um Arrhythmie zu erzielen, sind angegeben. Aus Winfree (1986)

3.6 Arrhythmie bei verschiedenen Temperaturen

rhythmisch sind oder nur die Synchronisation miteinander verloren haben. Wie läßt sich zwischen den beiden Möglichkeiten unterscheiden?

Um eine schwingende Zelle in ihrer Phase so zu verschieben, dass sie mit den anderen Zellen, die in anderen Phasen schwingen, nach dem Licht im gleichen Takt ist, wird ein längerer Lichtpuls gebraucht als bei Zellen, die alle arrhythmisch sind. Hier würde bereits ein kurzer Lichtpuls die Zellen anstossen, sodass sie wieder zu schwingen beginnen, und zwar alle im gleichen Takt.

Tatsächlich genügte bereits ein Lichtpuls, der nur ein Viertel so lang war wie der singuläre Reiz, um den Rhythmus der Blüten wieder herzustellen. Dieser Lichtpuls genügt nicht, durcheinander schwingende Zellen zu synchronisieren. Die Zellen sind also arrhythmisch, wenn die Blüten durch den besonderen Reiz ihren Rhythmus des Öffnens und Schliessens verloren haben.

Das läßt sich auch überprüfen, indem die Durchmesser der Zellen der Blütenblätter nach der kritischen Belichtung gemessen werden. Würden die Zellen noch schwingen, aber nicht synchron, müßten ihre Durchmesser variieren. Sie waren aber einheitlich gross.

3.5 Mit dem Singularitätspuls herumspielen

Wir sahen, dass man mit einem speziellen Lichtpuls zu einem bestimmten Zeitpunkt im Schlüpfzyklus von *Drosophila* Arrhythmie induzieren kann. Ein langer schwacher Puls war dabei genauso wirksam wie ein kurzer starker. Wie ist das damit bei *Kalanchoe*? Eine Reihe von Versuchen wurde durchgeführt, bei denen der Zeitpunkt der Belichtung, die Länge und

die Stärke des Lichtpulses variiert wurden. Die Stärke der Dämpfung wurde bestimmt und die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 wiedergegeben.

In einem weiteren Experiment wurden Intensität und Dauer variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 gezeigt.

Die Ergebnisse unterscheiden sich von denen, die man erwarten würde, wenn Reziprozität gelten würde. Das ist in Abbildung 3.16 gezeigt. Eine logarithmische Transformation des Lichtsignals zur Uhr würde die erwartete (rote) Kurve in der Abbildung in die experimentell gefundene (blaue) umwandeln. Wahrscheinlich gibt es also irgendeine logarithmische Veränderung des Lichtsignals vom Photorezeptor zur Uhr (siehe Engelmann et al. (1978))

3.6 Arrhythmie bei verschiedenen Temperaturen

Das Lichtsignal, welches den Rhythmus auslöscht, muss zunächst durch Photorezeptoren aufgenommen und dann zum Oszillator weitergeleitet werden. Die dabei ablaufenden Prozesse sind vermutlich temperaturabhängig. Sie würden bei höherer Temperatur schneller ablaufen als bei niedrigerer. Das läßt sich recht elegant testen, wenn man den Rhythmuslöschenden Lichtpuls statt bei den üblichen 22.5°C bei höheren oder niedrigeren Temperaturen anbietet. Würde er zur gleichen Zeit gegeben wie der Kontrollpuls bei 22.5°C, würde er vermutlich bei höherer Temperatur (27.5°C), früher am Oszillator ankommen. Der ist dann aber noch nicht in der kritischen Phase, zu der Arrhythmie induziert wird. Dass wird auch tatsächlich im Experiment gefunden (Abbildung 3.15, Engelmann and Heilmann (1981)). Er muss etwa eine halbe

3 Blumenuhr Kalanchoe

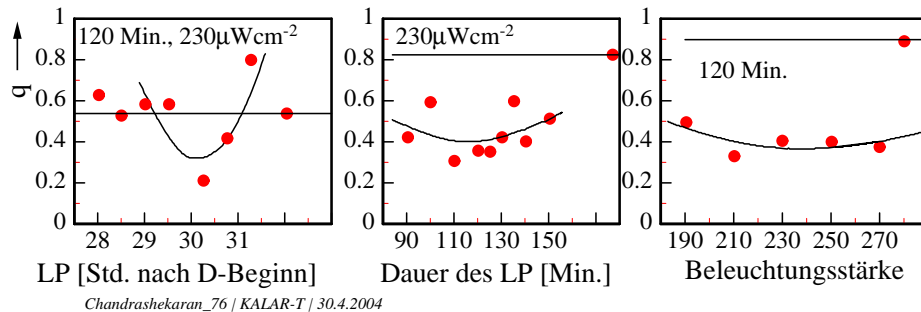


Abbildung 3.14: Links: Die Dämpfung war am höchsten (niedriger q -Wert), wenn der Lichtpuls zwischen der 30sten und 31sten Stunde nach Beginn der Dunkelheit gegeben wurde.

Mitte: Die Dauer des Lichtpulses kann zwischen 100 und 140 Minuten variiert werden und bewirkt dann immer noch Arrhythmie.

Rechtes: Die Intensität des roten Lichtpulses kann zwischen 200 und 270 $\mu W cm^{-2}$ variiert werden, um noch Arrhythmie zu induzieren. Die waagerechten Linien sind Werte der Kontrollen

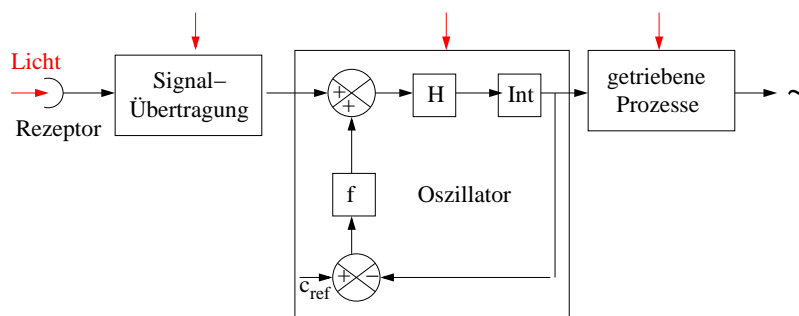
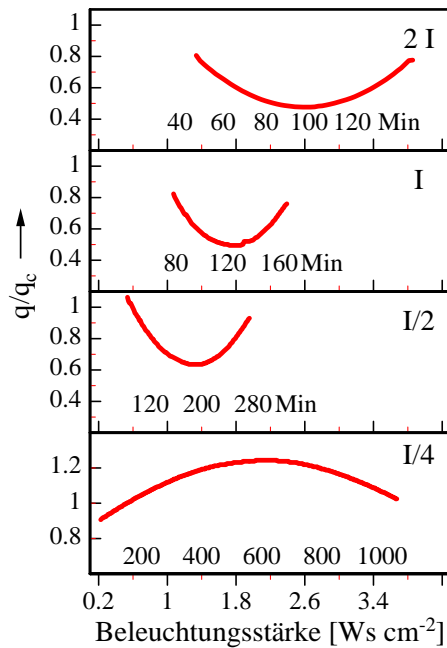
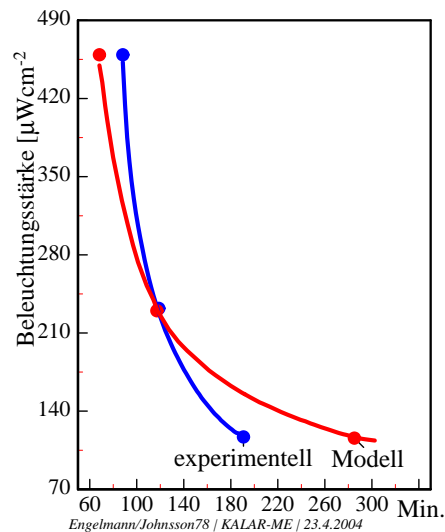


Abbildung 3.18: Licht verschiebt den Rhythmus der *Kalanchoe*-Blütenblattbewegung, indem in den Licht-Rezeptoren des Blütenblattes ein Signal gebildet wird, das den Oszillator in den Motorzellen in seiner Phase verschiebt. Die vom Oszillator gesteuerten Prozesse (Turgor) werden ebenfalls Phasen-verschoben und die Blütenblattbewegung dient als Zeiger dieser Verschiebung. Das Bild zeigt, dass die Temperatur (rote Pfeile) an verschiedenen Stellen des Modells einwirkt: Die Signalübertragung wird durch höhere Temperaturen beschleunigt und durch niedrigere verlangsamt, der Oszillator wird Phasen-verschoben (verfrüht durch höhere Temperaturen), und die getriebenen Prozesse hinken bei niedrigeren Temperaturen stärker dem Oszillator hinterher als bei höheren Temperaturen. Aus Engelmann and Heilemann (1981)

3.6 Arrhythmie bei verschiedenen Temperaturen



Chandrashekar_76 | KALAR-S | 30.4.2004

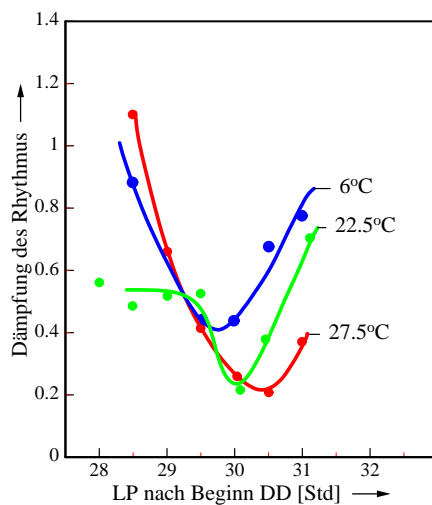


Engelmann/Johnsson78 | KALAR-ME | 23.4.2004

Abbildung 3.15: Um zu prüfen, ob Reziprozität gilt, wurde die Intensität des kritischen Lichtpulses verdoppelt ($2I$), halbiert ($I/2$) oder geviertelt ($I/4$) und die Dauer des Lichtpulses variiert. Bei $2I$ (oberste Kurve) führten 100 Minuten Beleuchtung zum kleinsten q -Wert (als Maß der Dämpfung), während es beim Standardpuls mit der Intensität I 120 Minuten waren (2. Kurve von oben). 200 Minuten ist der entsprechende Wert für $I/2$ (dritte Kurve von oben). Bei einer Intensität von $I/4$ wurde keine Arrhythmie mehr induziert (die q -Werte liegen alle über 0,9, unterste Kurve). Aus Engelmann et al. (1978)

Abbildung 3.16: Würde bei der Induktion von Arrhythmie bei der *Kalanchoe*-Blütenblattbewegung Reziprozität gelten (das heißt, das Produkt von Intensität * Dauer muss konstant sein), würde die rote Kurve erwartet werden. Die Versuche zeigen jedoch eine Kurve (blau), die von dieser erwarteten abweicht. Wenn das Signal des Lichtes auf dem Weg zur Uhr logarithmisch transformiert wird, geht die erwartete (rote) Kurve in die blaue über. Aus Engelmann et al. (1978)

3 Blumenuhr Kalanchoe



Heilemann_81 | HEILEMANN2 | 23.4.2004

Abbildung 3.17: Ein singulärer Lichtpuls muss bei einer höheren Temperatur (27.5°C) während der Belichtung eine halbe Stunde später gegeben werden als bei der normalen 22.5°C-Temperatur, um in den Blüten Arrhythmie zu erzeugen. Bei niedrigerer Temperatur (6°C) liegt der Zeitpunkt 15 Minuten früher als bei der normalen 22.5°C-Temperatur, um den Rhythmus der Blüten zu dämpfen. Aus Engelmann and Heilemann (1981)

Stunde später als üblich gegeben werden. Bei niedrigerer Temperatur (6°C) dauert es hingegen länger, bis das Lichtsignal zum Oszillator gelangt ist. Die kritische Phase ist dann schon vorbei. Der Lichtpuls muss also, um Arrhythmie zu induzieren, früher als üblich gegeben werden. Auch das wurde experimentell gefunden (Abbildung 3.15). Man kann zeigen, dass die Temperatur das Lichtsignal auf dem Weg zum Oszillator, den Oszillator und das Signal vom Oszillator zum rhythmischen Prozess (Turgorschwankungen) beeinflusst (Abbildung 3.18, Engelmann and Heilemann (1981)).

3.7 Und was man damit tun kann

Arrhythmie und weisse Löcher sind interessante Eigenschaften biologischer Uhren und geben Auskunft über ihre Struktur und Funktionsweise. Aber kann man diese Eigenschaften auch für etwas handgreiflichere Dinge benutzen? Dieser Abschnitt und das nächste Kapitel werden zeigen, dass es sich nicht nur um theoretische Spielereien handelt.

Wenn wir wissen wollen, wie ein Oszillator funktioniert und aufgebaut ist, gibt es verschiedene Vorgehensweisen. Eine ist, mit bestimmten Substanzen das schwingende System zu behandeln. Wenn es dadurch etwas schneller oder langsamer schwingt, könnte eine *Zustandsvariable* des Oszillators beeinflusst worden sein, also ein essentieller Teil. Muss aber nicht. Es könnte sich auch nur ein *Parameter* geändert haben. Wie kann man zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden? Hier hilft der singuläre Zustand weiter.

Kalanchoe-Blüten eignen sich recht gut, um herauszufinden, ob bestimmte Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie

3.8 Arrhythmisches Aussehen muß nicht auf Arrhythmie beruhen

den Rhythmus verlangsamen oder beschleunigen, auf den Uhr-Mechanismus wirken. Das geht folgendermassen: Wir bringen Blüten durch spezielle Belichtung in einen arrhythmischen Zustand. Geben wir nun einige Tage später eine Substanz zu, von der wir vermuten, dass sie in das Uhrwerk eingreift (also eine Zustandsvariable verändert), müsste der Oszillator wieder zum Schwingen kommen. Wenn die Substanz das Uhrwerk nicht beeinflusst, sollte der arrhythmische Zustand beibehalten werden. Trotzdem könnte diese Substanz durchaus die Periodenlänge ändern (indem sie einen Parameter ändert). Für beide Fälle gibt es Beispiele.

In Abbildung 3.19 sind einige Kurven von *Kalanchoe*-Blüten zusammengestellt, die das Gesagte illustrieren sollen. Zunächst sind einige Beispiele für die Induktion von Arrhythmie durch rotes, weisses und UV-Licht gezeigt (Abbildung 3.19, a-c). Ein zweiter Lichtpuls kann die Blüten wieder zum Schwingen bringen, wenn er stark genug ist.

Interessant ist, dass auch ein Temperaturpuls (6°C, Abbildung 3.19, d und e) den Rhythmus wieder anstösst, wenn er lange genug gegeben wird (eine Stunde genügt nicht, vier Stunden sind ausreichend). Auch eine vierstündige Begasung der *Kalanchoe*-Blüten mit Stickstoff bringen sie wieder zum Schwingen (Abbildung 3.19, f).

Lithiumsalze können bei verschiedenen Organismen die Tagesuhr verlangsamen (Engelmann (1987)). Es lag daher nahe, zu testen, ob dabei die Uhr direkt beeinflusst wird. Die Versuche wurden mit *Kalanchoe*-Blüten durchgeführt und waren erfolgreich: Lithiumchlorid konnte arrhythmische Blüten wieder zum Schwingen bringen (drei Kurven in Abbildung 3.20).

Vanadat (Natrium-Orthovanadat) bringt

dagegen die arrhythmischen Blüten nicht zum Schwingen (Abbildung 3.21). Diese Substanz hemmt die ATPasen im Plasmalemma. Sie scheinen demnach nicht am Mechanismus des Oszillators direkt beteiligt zu sein, obwohl Vanadat je nach dem Zeitpunkt im Schwingungszyklus der *Kalanchoe*-Blüte als Puls gegeben den Rhythmus verschieben kann (Eckhardt and Engelmann (1984)).

Auch Polyethylenglykol (PEG) kann bei arrhythmischen Blüten die tagesperiodische Bewegung wieder auslösen (Abbildung 3.20). PEG entzieht den Blüten stark Wasser und verändert damit den Turgor der Motorzellen. Da dieser für die Bewegung der Motorzellen verantwortlich ist, ist das Ergebnis nicht überraschend.

Dauernd gegebenes Methyljasmonat (60ppm) verkürzt die Periodenlänge der *Kalanchoe*-Blütenuhr um etwa 1.5 Stunden (Engelmann et al. (1997)). Daher haben wir untersucht, ob diese Substanz arrhythmische Blüten wieder zum Schwingen bringen kann. Das war nicht der Fall (Abbildung 3.23).

3.8 Arrhythmisches Aussehen muß nicht auf Arrhythmie beruhen

Wenn man eine scheinbar arrhythmische Situation findet, muss sorgfältig geprüft werden, ob die zugrundeliegenden Uhren tatsächlich nicht mehr laufen. Wir haben das bereits in Abschnitt 2.4 auf Seite 21 diskutiert. Durcheinanderlaufende Uhren können einen Rhythmus so durcheinander bringen, dass er nicht mehr zu sehen ist. Hier ist ein weiteres Beispiel von den *Kalanchoe*-Untersuchungen, in dem gezeigt wurde, dass eine scheinbare Arrhythmie der Blütenblattbewegung in Wirklichkeit aus laufenden Uhren be-

3 Blumenuhr Kalanchoe

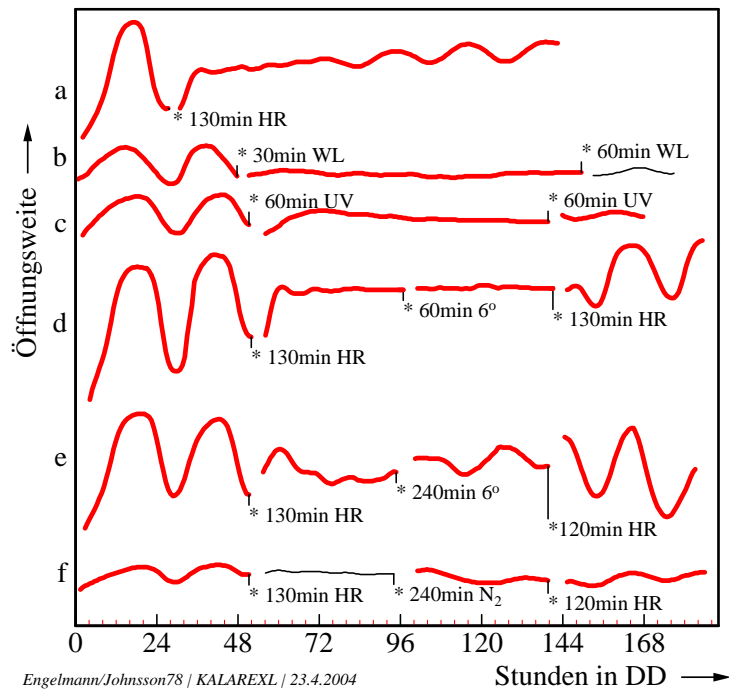


Abbildung 3.19: Beispiele für Arrhythmie und Wieder-Anstoss des *Kalanchoe*-Oszillators.

a: Die Blütenblattbewegung wurde durch einen Hellrot-Lichtpuls von 130 Minuten Dauer 30 Stunden nach Beginn der Konstantbedingungen zstark gedämpft, begann aber nach einiger Zeit wieder zu schwingen.

b: Hier wurde der Rhythmus ausgelöscht (statt Hellrot wurde 30 Minuten weisses Licht gegeben). Ein zweiter Lichtpuls (60 Minuten weisses Licht) brachte die Blüte wieder zum Schwingen.

c: Auch ein 60 minütiger UV-Puls kann Arrhythmie erzeugen. Ein zweiter UV-Puls der gleichen Stärke und Dauer bringt die Blüte wieder zum Schwingen.

d: Wird während der Arrhythmie für 60 Minuten die Temperatur auf 6°C abgesenkt, bleibt die Blüte bewegungslos. Erst ein Lichtpuls von 130 Minuten Hellrot stösst den Rhythmus wieder an. e: Erst eine 240 Minuten lange Abkühlung auf 6°C kann den Oszillator wieder anstossen. Ein zweiter Lichtpuls (120 Minuten Hellrot) erhöht die Amplitude der Schwingung.

f: Hier wurde die Bewegung der Blüte nach Arrhythmie durch einen vierstündigen Stickstoff-Puls induziert. Aus Engelmann et al. (1978)

3.8 Arrhythmisches Aussehen muß nicht auf Arrhythmie beruhen

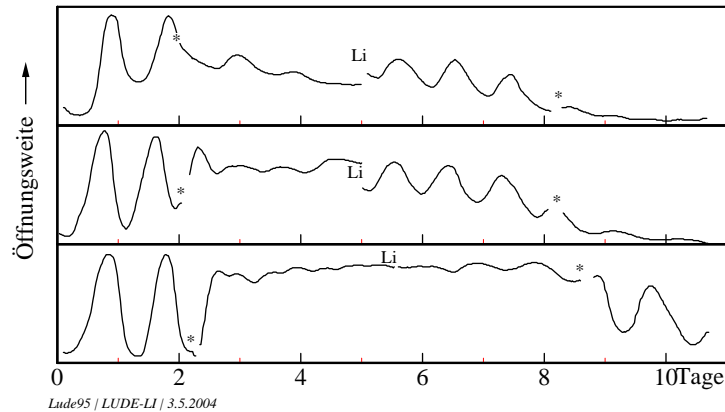


Abbildung 3.20: Arrhythmische *Kalanchoe*-Blüten können durch eine Lithiumchlorid-Lösung wieder zum Schwingen gebracht werden. Die Blütenblattbewegung wurde durch einen ersten kritischen Hellrot-Lichtpuls (*) stark gedämpft. Werden die Blüten zum markierten Zeitpunkt (Li) in eine Lithiumchlorid-Lösung (2mM) übertragen, begannen sie wieder zu schwingen. Ein zweiter Lichtpuls (*) wurde benutzt, um zu testen, ob die Blüten noch schwingen können (die Blüten verlieren nach längerer Zeit im abgeschnittenen Zustand -und auch an der Pflanze- ihr Bewegungsvermögen). Aus Lude (1995)

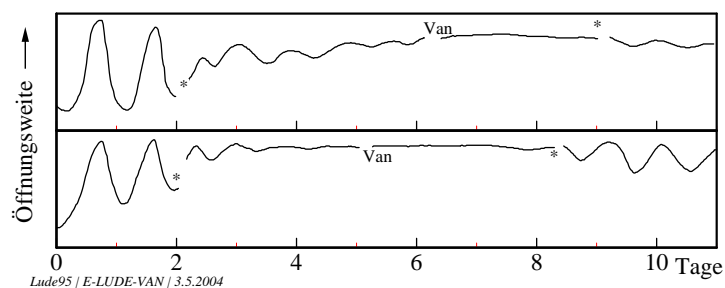


Abbildung 3.21: Arrhythmische *Kalanchoe*-Blüten (durch kritischen Hellrot-Lichtpuls * induziert) können durch eine Vanadat-Lösung (10mM) nicht wieder zum Schwingen gebracht werden (die ersten beiden Kurven). Ein zweiter Lichtpuls (*) zeigt, dass die Blüten noch schwingen können. Aus Lude (1995)

3 Blumenuhr Kalanchoe

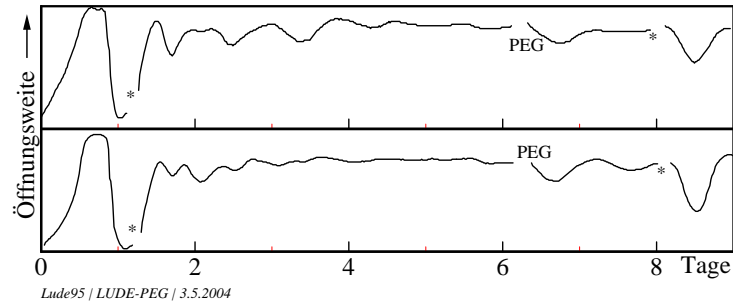


Abbildung 3.22: Blüten von *Kalanchoe* wurden durch einen kritischen Hellrot-Lichtpuls (*) arrhythmisch gemacht. Einige Tage später wurden die Scheiben mit den Blüten auf eine konzentrierte Polyethylenglykol-Lösung gelegt. Nach vier Stunden wurde die PEG-Lösung abgewaschen und die weiter gerigistriert. Die Blüten begannen wieder zu Schwingen. Ein zweiter Lichtpuls (*) verstärkte die Schwingung. Nach Lude (1995)

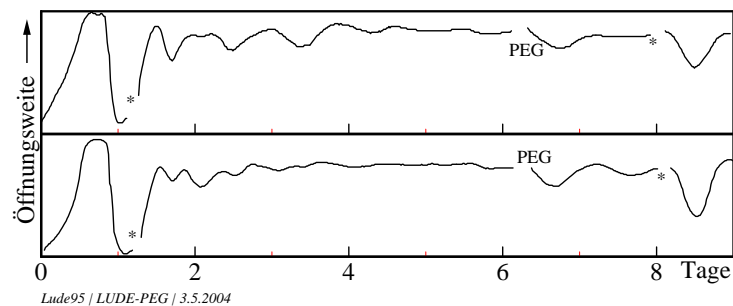


Abbildung 3.23: Eine *Kalanchoe*-Blüte wurde durch einen kritischen Hellrot-Lichtpuls (*) arrhythmisch gemacht und dann für 3 Stunden mit Methyljasmonat (gasförmig) behandelt. Es war nicht in der Lage, die Blüten wieder zum Schwingen zu bringen. Ein zweiter Lichtpuls (*) zeigt, dass die Blüte durchaus noch schwingefähig war. Nach Engelmann et al. (1997)

3.8 Arrhythmisches Aussehen muß nicht auf Arrhythmie beruhen

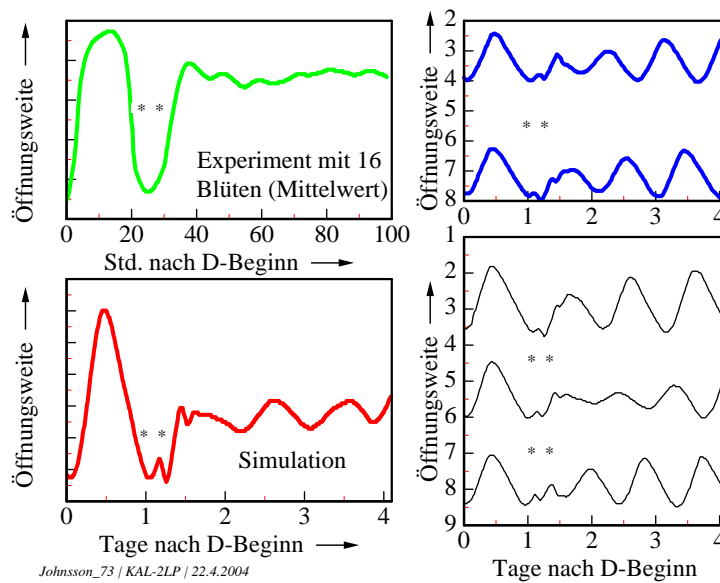


Abbildung 3.24: Eine Küvette mit sechzehn Blüten von *Kalanchoe* wurden mit zwei Lichtpulsen bestrahlt, die einige Stunden hintereinander gegeben wurden (**). Die gemessene Kurve (alle Blüten wurden mit nur einer Photozelle gemessen; daher ist das Verhalten der einzelnen Blüten nicht bekannt) sieht ziemlich arrhythmisch aus (grüne Kurve oben links). Es kann aber gezeigt werden, dass die scheinbare Arrhythmie sich aus zwei unterschiedlichen Effekten der Lichtpulse ergibt: Anfängliche, aber vorübergehende Dämpfung und unterschiedliche Phasenlage der Blütenblattbewegungen. Der erste Effekt ist in den rechten oberen Kurven (blau) gezeigt, der zweite Effekt in den rechten unteren Kurven (schwarz). Wenn diese Effekte addiert werden, erhält man die untere linke Kurve (rot), die der darüber liegenden grünen Kurve ähnelt. Nach Engelmann et al. (1997)

3 *Blumenuhr* Kalanchoe

steht. Das wurde bei Versuchen gefunden, bei denen mit einem zweiten Lichtpuls ein Phasen-verschobener Rhythmus geprüft werden sollte. Das arrhythmische Aussehen der 16 gemessenen Blüten wird durch zwei Effekte vorgetäuscht: Anfängliche, aber vorübergehende Dämpfung und unterschiedliche Phasenlage der Blütenblattbewegungen. Nur das gemeinsame Registrieren der Blüten hat den scheinbar arrhythmischen Zustand erzeugt. Abbildung 3.24 zeigt die Ergebnisse und die Prüfung durch Simulationen.

Ein weiteres Beispiel könnte der Bericht von Steinlechner et al. (2002) sein. Er findet Arrhythmie in der lokomotorischen Aktivität von Sibirischen Hamstern, nachdem zwei Lichtpulse gegeben wurden. Natürlich wurden hierbei die Aktivitäten der einzelnen Hamster getrennt gemessen. Aber das circadiane Zentrum im suprachiasmatischen Kern des Hypothalamus im Gehirn ist aus zahlreichen Oszillatoren zusammengesetzt, die mindestens zwei verschiedene Populationen bilden. Wenn diese ähnlich reagierten wie es bei den beiden Lichtpulsen im Fall der *Kalanchoe*-Blüten war, könnte es sich auch hier um laufende Oszillatoren handeln, die aber desynchronisiert wurden.

4 Weitere Beispiele für den singulären Punkt

Nach den Untersuchungen von Winfree an *Drosophila* versuchte man, auch an anderen Organismen Arrhythmie zu erzeugen. Da es sich beim Schlüpfen von *Drosophila* um einen Populationsrhythmus handelt, der sich nur mit zahlreichen Fliegen zu erkennen gibt, lag es nahe, nach einem Beispiel zu suchen, bei dem bereits am Einzeltier ein Rhythmus für längere Zeit zu beobachten ist. Eric Peterson in England fand in Stechmücken und ihrer Aktivität ein geeignetes Objekt. Sie sind in der Dämmerungszeit abends und morgens aktiv. Wird die Aktivität der Tiere individuell registriert, kann man tatsächlich mit einem kritischen Lichtpuls ihren Rhythmus massiv beeinflussen (Peterson (1980), Peterson (1981a), Peterson (1981b)).

An anderen Insekten ist das nicht gelungen. So versuchte Gottfried Wiedenmann in Tübingen, an Küchenschaben ihren Aktivitätsrhythmus durch eine gezielte Belichtung auszuschalten. Aber vergeblich (Wiedenmann (1977)). Auch an *Drosophila*-Fliegen war es nicht möglich, ihren Aktivitätsrhythmus zu beseitigen.

Bei einzelligen Algen gelang es in zwei Fällen, Arrhythmie zu induzieren. Beim Augentierchen *Euglena* kann die Zellteilung, die unter bestimmten Bedingungen tagesperiodisch erfolgt, durch einen gezielten Lichtpuls arrhythmisch gemacht werden. Die Zellen teilen sich danach dauernd, und nicht nur in bestimmten Zeitfenstern, die durch die Tagesuhr geöffnet werden. Bei *Gonyaulax polyedra*, einem Dinoflagellaten, kann eine kriti-

sche Dosis von Anisomycin (300 nM) den Glimm-Rhythmus stoppen (Taylor et al. (1982)).

Schliesslich fand Arthur Winfree auch bei der Glykolyse von Hefezellen, die unter bestimmten Bedingungen oszillatorisch abläuft, Arrhythmie, wenn ein bestimmter Reiz (Sauerstoff-Puls) gegeben wurde.

Beim Transpirationsrhythmus (Abgabe von Wasserdampf über die Spaltöffnungen) von Haferblättern gelang es Johnson and Brogardh (1979), einen stabilen Singularitätspunkt nachzuweisen, der durch einen spezifischen Lichtpuls erreicht werden konnte.

Es ist möglich, dass Arrhythmie beim Menschen nicht nur das Herzflimmern bewirken kann. Auch das Atmen ist durch einen Oszillator gesteuert. Paydarfar et al. (1986) reizten den oberen Larynx-Nerv von Katzen. Über diesen Nerv kommen normalerweise Impulse, die das Einatmen verkürzen und das Ausatmen verlängern. Die Forscher variierten den Beginn und die Dauer des Reizes und registrierten die Aktivität des phrenischen Nerven zwischen Hirnstamm und Zwerchfell (Diaphragma). Je nach Reizdauer erhielten sie starke und schwache Phasenverschiebungen (siehe linkes und rechtes oberes Bild in Abbildung 4.1). Ein Kontourbild zeigt weisse Löcher bei einem Reiz von 0.75 Sekunden kurz vor der (erwarteten) Einatmung. Im Experiment wurde das Einatmen der erwachsenen Katzen nicht einge-

4 Weitere Beispiele für den singulären Punkt

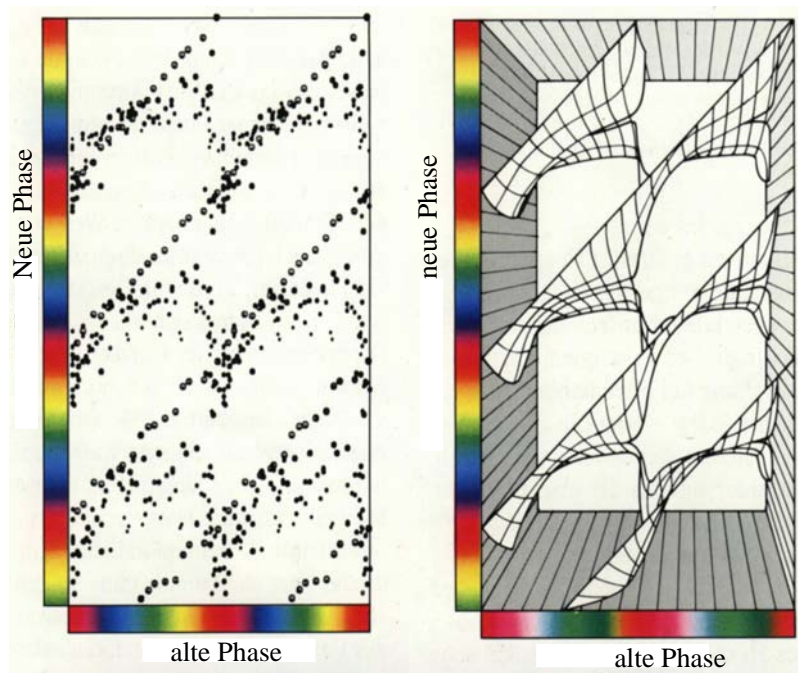


Abbildung 4.1: Zeitkristall des Atemrhythmus der Katze: Der obere Larynx-Nerv von Katzen wurde gereizt und damit das Einatmen verkürzt und das Ausatmen verlängert. Beginn und die Dauer des Reizes wurden variiert und die Aktivität des phrenischen Nerven zwischen Hirnstamm und Zwerchfell (Diaphragma) registriert. Es ergaben sich starke und schwache Phasenverschiebungen (siehe linken und rechten Teil des Bildes). Links: Jeder Punkt steht für den Beginn des Einatmens. Dicke Punkte im Vordergrund (siehe dazu auch den rechten Teil des Bildes) sind ohne Reiz, die kleinsten Punkte im Hintergrund erhielt man bei Reizen von 2 Sekunden. Ein Atemzyklus dauert 5 Sekunden (zwei Zyklen sind auf der waagerechten Achse dargestellt). Das dreidimensionale Bild (rechts) zeigt die Kontouren mit schwachen Reaktionen im Vordergrund und starken im Hintergrund. Schaut man von oben auf das rechte obere Bild und kodiert die Phasen mit Farben, erhält man die Kontourkarte in Abbildung 4.2. Aus Winfree (1988)

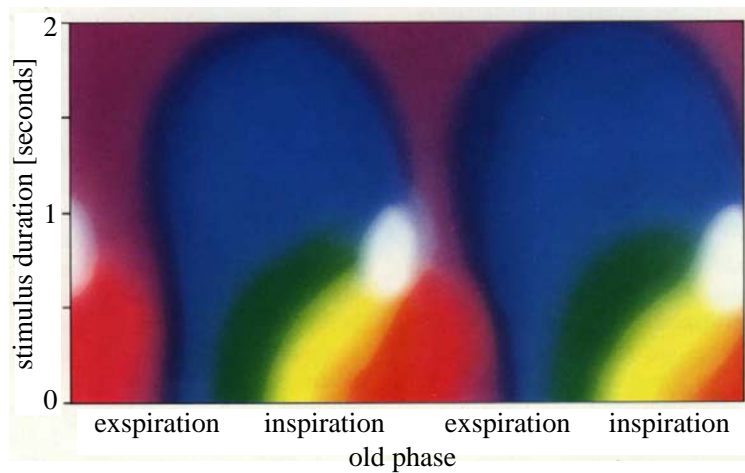


Abbildung 4.2: Eine Kontourkarte des Atemrhythmus der Katze: Schaut man von oben auf das rechte Bild der Abbildung 4.1 und kodiert die Phasen mit Farben, erhält man diese Kontourkarte mit drei weissen Löchern. Aus Winfree (1988)

stellt¹, aber die danach beobachteten Phasen waren nicht mehr voraussagbar. Es wäre möglich, dass bei manchen jungen Katzen ein solcher kritischer Puls die Atmung aussetzen lässt. Ähnliches könnte auch für den plötzlichen Krippentod von Kindern verantwortlich sein.

¹der singuläre Zustand war also nicht stabil

4 Weitere Beispiele für den singulären Punkt

Literaturverzeichnis

- M. K. Chandrashekar and W. Engelmann. Amplitude attenuation of the circadian rhythm in *Drosophila* with light pulses of varying irradiance and duration. *Int. J. Chronobiol.*, 4:231 – 240, 1976.
- D. Eckhardt and W. Engelmann. Involvement of plasmalemma-ATPases in circadian rhythms of succulent herb *Kalanchoe blossfeldiana* (Crassulaceae). *Ind. J. Exp. Biol.*, 22:189–194, 1984.
- W. Engelmann. Effects of lithium salts on circadian rhythms. In A. Halaris, editor, *Neuropsychiatric disorders and disturbances in the circadian system of man*, pages 263–289. Elsevier, 1987.
- W. Engelmann. *Blumenuhren*. <http://bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de>, 2003a.
- W. Engelmann. *Fliegende Uhren*. <http://bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de>, 2003b.
- W. Engelmann. *Wie Pflanzen wachsen und sich bewegen*. <http://bioclox.bot.biologie.uni-tuebingen.de>, 2003c.
- W. Engelmann and M. Heilemann. Effects of temperature on the circadian rhythm of *Kalanchoe*. In H. Halberg, L. E. Scheving, E. W. Powell, and D. K. Hayes, editors, *XIII Intern. Conf., Proceedings*, pages 263–268. Publ. House 'Il Ponte', Milano, 1981.
- W. Engelmann and A. Johnsson. Rhythms in organ movement. In P. J. Lumsden and A. J. Millar, editors, *Biological rhythms and photoperiodism in plants*, Environmental Plant Biology. Bios Scientific Publishers Oxford, Washington DC, 1998.
- W. Engelmann, A. Johnsson, H. G. Kobler, and M. Schimmel. Attenuation of the petal movement rhythm of *Kalanchoe* with light pulses. *Physiol. Plant.*, 43:68–76, 1978.
- W. Engelmann, A. Sommerkamp, S. Veit, Y1997, TMethyl-jasmonate affects the circadian petal movement of *Kalanchoe* flowers, JBiological Rhythm Research, V28, and N4. Methyl-jasmonate affects the circadian petal movement of *Kalanchoe* flowers. *Biological Rhythm Research*, 28:377–390, 1997.
- U. Hamm, M. K. Chandrashekar, and W. Engelmann. Temperature sensitive events between photoreceptor and circadian clock? *Z. Naturforschung 30c*, 240-244, 1975.
- A. Johnsson and O. Brogardh, T. Holje. Oscillatory transpiration rhythm of *Avena* plants: Perturbation experiments provide evidence for a stable point of singularity. *Physiol. Plant.*, 45:393–398, 1979.
- A. Johnsson and H. G. Karlsson. A feedback model for biological rhythms. I. Mathematical description and basic properties of the model. *Journal of theoretical Biology*, 36:153–174, 1972.
- H. G. Karlsson and A. Johnsson. A feedback model for biological rhythms.

Literaturverzeichnis

- II. Comparisons with experimental results, especially on the petal rhythm of *Kalanchoe*. *J. Theor. Biol.*, 36:175–194, 1972.
- P. L. Lakin-Thomas. A beginner's guide to limit cycles, their uses and abuses. *Biol. Rhythm Res.*, 26:216–232, 1995.
- A. Lude. Chemische Beeinflussung der circadianen Blütenblattbewegung von *Kalanchoe blossfeldiana*. Zulassungsarbeit, Universität Tübingen, 1995.
- R. Maier. Phase-shifting of the circadian rhythm of eclosion in *Drosophila pseudoobscura* with temperature pulses. *J. interdisc. Cycle Res.* 4, 125-135, 1973.
- D. Paydarfar, F. L. Eldrige, and J. P. Kiley. Resetting of mammalian respiratory rhythm: existence of a phase singularity. *Am. J. Physiology*, 250:R721–R727, 1986.
- E. L. Peterson. A limit cycle interpretation of a mosquito circadian oscillator. *J. theoretical Biology*, 84:281–310, 1980.
- E. L. Peterson. Dynamic responses of a circadian pacemaker. I. Recovery from extended light exposure. *Biol. Cybern.*, 40:171–179, 1981a.
- E. L. Peterson. Dynamic responses of a circadian pacemaker. II Recovery from light pulse perturbations. 40:181–194, 1981b.
- S. Steinlechner, A. Stieglitz, and T. Ruf. Djungarian hamsters; a species with a labile circadian pacemaker? Arrhythmicity under a light-dark cycle induced by short light pulses. *Journal of Biological Rhythms*, 17:248–259, 2002.
- W. Taylor, R. Krasnow, J. C. Dunlap, H. Broda, and J. W. Hastings. Critical pulses of anisomycin drive the circadian oscillator in *Gonyaulax* towards its singularity. *JCP*, 148:11–25., 1982.
- G. Wiedenmann. No 'point of singularity' in the circadian activity rhythm of the cockroach *Leucophaea maderae*? *Chronobiologia*, 4:165, 1977.
- A. Winfree. Sekundenherztod: Hilfe von der Topologie? *Bild der Wissenschaft*, pages 92–105, 1983.
- A. T. Winfree. *The geometry of biological time*. Springer, New York, 1980.
- A. T. Winfree. *The timing of biological clocks*. Scientific American Books, Inc., New York, 1986.
- A. T. Winfree. *When time breaks down: The three-dimensional dynamics of electrochemical waves and cardiac arrhythmias*. Princeton University Press, Princeton, N. J., 1987.
- A. T. Winfree. *Biologische Uhren: Zeitstrukturen des Lebendigen*. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 1988.