

Saisonale Rhythmen und ihre Synchronisation beim Europäischen Feldhamster (*Cricetus cricetus*)

Von der Fakultät der Geo- und Biowissenschaften der
Universität Stuttgart genehmigte Abhandlung zur Erlangung der
Würde des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von Stefanie Monecke aus Bramsche

Hauptberichterin: Prof. Dr. Franziska Wollnik

Mitberichter: Prof. Dr. Wolfgang Hauber

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2003

Biologisches Institut der Universität Stuttgart, 2004

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbstständig verfasst. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die Koautoren der zur Veröffentlichung eingereichten Manuskripte sind jeweils genannt.

Stuttgart, den 09. Oktober 2003

Stefanie Monecke

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Summary	11
2. Einleitung	13
2.1. Zur Biologie des Europäischen Feldhamsters	13
2.1.1. Lebensweise	14
2.1.2. Verbreitung und Lebensraum.....	16
2.1.3. Populationsdynamik und Gefährdung.....	18
2.1.4. Aktuelles.....	21
2.2. Grundlagen biologischer Rhythmen	23
2.2.1. Exogene Rhythmen	23
2.2.2. Endogene Rhythmen	23
2.2.3. Synchronisation biologischer Rhythmen	25
2.2.4. Adaptiver Wert endogener Rhythmen.....	25
2.3. Tagesrhythmen und das circadiane System der Säugetiere	27
2.3.1. Neuronale Grundlagen circadianer Rhythmen.....	27
2.3.2. Synchronisation und Photosensitivität des circadianen Systems.....	28
2.3.3. Molekulare Grundlagen des circadianen Systems	33
2.3.4. Die Theorie der 2 gekoppelten Oszillatoren	35
2.3.5. Melatonin als circadianes Signal.....	37
2.4. Saisonale Rhythmen und das circannuale System der Säugetiere	44
2.4.1. Klassifikation saisonaler Rhythmen.....	45
2.4.2. Neuronale und humorale Grundlagen von Typ-II-Rhythmen.....	48
2.4.3. Synchronisation circannualer Zyklen.....	50
2.5. Fragestellung	63
2.5.1. Experiment 1	63
2.5.2. Experiment 2	64

3. Ergebnisse	67
3.1. Experiment 1	67
3.2. Experiment 2	67

European hamsters (Cricetus cricetus) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression **69**

Abstract	70
Introduction	71
Materials and Methods	73
Animals	73
Experiment 1: Timing of gonadal development under LD _{nat}	74
Experiment 2: Effect of long photoperiods in winter	74
Experiment 3: Gonadal development under accelerated and semi-natural photoperiods	74
Statistics	76
Results	77
Experiment 1: Timing of gonadal development under LD _{nat}	77
Experiment 2: Effect of long photoperiods in winter	78
Experiment 3: Gonadal development under accelerated and semi-natural photoperiods	80
Discussion	82
Acknowledgements	86
References	87

The two physiological Identities of the European Hamster (Cricetus cricetus L.) – A Race against the Time of Year **91**

Literature:	96
--------------------------	-----------

Seasonal variations in circadian rhythms characterize a phase of sensitivity to short photoperiods in the European hamster, Cricetus cricetus **99**

Abstract	100
Keywords	100
Abbreviations	100
Introduction	101

Material and methods	104
Animals	104
Experimental design.....	104
Reproductive status and body weight.....	105
Urine sampling and aMT6s assay	106
Locomotor activity	107
Statistical analysis	109
Results	110
Seasonal rhythms of reproduction and body weight	110
Seasonal changes in the daily patterns of locomotor activity and urinary aMT6s excretion.....	111
Temporal relation of seasonal cycles in body weight, reproductive status, aMT6s excretion and wheel running activity rhythms.....	119
Discussion.....	122
Seasonal cycles of reproduction and body weight	122
Seasonal changes in aMT6s excretion	123
Wheel-running activity.....	124
Temporal relationship of seasonal cycles.....	126
Photoperiodic time measurement	127
Acknowledgements.....	130
References	131
4. Zusammenfassende Diskussion.....	137
4.1. Feldhamster zeigen im Anschluss an die Gonadenregression eine vorübergehende insensitive Phase für lange Photoperioden.....	137
4.2. Saisonale Veränderungen von circadianen Rhythmen charakterisieren eine sensitive Phase für kurze Photoperioden beim Europäischen Feldhamster (Cricetus cricetus).....	143
4.2.1. Saisonale Zyklen in der Reproduktion und im Körpergewicht.....	143
4.2.2. Saisonale Veränderungen in der aMT6s Exkretion.....	145
4.2.3. Laufradaktivität	146
4.2.4. Zeitliche Beziehungen der saisonalen Zyklen.....	148
4.2.5. Photoperiodische Zeitmessung.....	149
4.3. Ausblick.....	153

5. Literaturverzeichnis..... 157

6. Danksagung 177

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

SCN	suprachiasmatischer Nucleus (<i>suprachiasmatic nucleus</i>)
τ	endogene Periodenlänge des circadianen Systems
T	exogene Periodenlänge des Zeitgebers
RHT	Retinohypothalamischer Trakt (<i>retinohypothalamic tract</i>)
IGL	I nter g eniculate L eamplet
GHT	g eniculo h ypothalamischer T rakt
LD	täglicher Zyklus von L icht und D unkelheit
LD _{nat}	natürliche Photoperiode
LD _{shift}	auf ½ Jahr verkürzter photoperiodischer Zyklus
ϕ	(Phi) Phasenlage des endogenen Zyklus
ψ	(psi) Phasenwinkel zwischen dem Zeitgeber und der endogenen Rhythmik
α	(Alpha) Aktivitätsphase
M	<i>morning oscillator</i>
E	<i>evening oscillator</i>
CT	circadiane Zeit (vom engl.: <i>circadian time</i>)
τ RC	Geschwindigkeits Antwort Kurve (vom engl.: <i>velocity response curve</i>)
IEG	vom engl.: <i>immediate early gene</i>
PVN	hypothalamischer <i>Nucleus paraventricularis</i>
PVT	thalamischer <i>Nucleus paraventricularis</i>
cAMP	zyklisches Adenosin M onophosphat
5HTP	5-Hydroxytryptophan
5HT	5-Hydroxytryptamin , Serotonin
NAT	N-Acetyl-Transferase
HIOMT	H ydroxy i ndole- O - M ethyltransferase
AAAD	Aromatische-L-Aminosäure Decarboxylase
LH	L uteinisierendes H ormon
PT	<i>Pars tuberalis</i>
NPY	N euro p eptid Y

1

Summary

The distribution area of the European hamster (*Cricetus cricetus*) extends over the temperate zone of the Eurasian continent. Thus, the habitat is characterized by dramatic seasonal changes in climate, vegetation and food availability. In adaptation to these seasonal changes European hamsters exhibit pronounced seasonal variations in their physiology and behavior. The breeding season is restricted to spring and early summer, while the hard conditions of winter are avoided by hibernation. In addition body weight increases in the first half of year and decreases after the summer solstice. These seasonal changes have a strong endogenous component because they persist even under constant conditions (Canguilhem, 1989), i. e., they reflect most likely a true circannual rhythm. Finally, seasonal variations have been observed in two circadian functions, namely the daily activity pattern and the nocturnal melatonin secretion. During most parts of the year the activity rhythm is weak or even arrhythmic, whereas high levels of activity and a precise activity pattern are observed only during two to three months around the summer solstice (Wollnik et al., 1991). The nightly melatonin secretion shows a complementary rhythm: Nocturnal melatonin excretion is high during short photoperiods and almost absent around the longest day (summer solstice) (Vivien-Roels et al., 1992).

Usually, the period length of endogenous circannual rhythms differs from the annual cycle of the environment (that's why they are called circa-annual). Thus the circannual clock has to be synchronized to the environmental oscillation at least once a year. It is well accepted that the annual changes in day length (photoperiod) provide the most important environmental signal to synchronize or entrain the circannual rhythm. This thesis deals with the question how the photoperiodic entrainment mechanism works in European hamsters.

The synchronization of annual rhythms in the European hamster is the result of an interaction between seasonal changes in photoperiod and seasonal changes in the animal's responsiveness to these photoperiods. One phase of sensitivity to short photoperiods was

already discovered by (Saboureau et al., 1999) and lasts from mid-May to mid-July, when a decrease in day length induce gonadal regression and a decrease in body weight. In the first part of the present thesis the hypothesis of a sensitive phase to the opposite change of day length in winter was examined. The results demonstrated the existence of an annual phase of sensitivity to long photoperiods between mid-November and March/April. During this phase of sensitivity, exposure to a long photoperiod (LD16:8) induced gonadal development within 3 weeks. The experiments also demonstrated that under natural conditions European hamsters are not able to perceive long photoperiods (LD16:8) before mid-November. This is an important difference to other hamster species, in which regrowth of the gonads can be stimulated by exposure to long photoperiods at any stage of gonadal regression. Additional experiments indicated that a photoperiod of approximately 13 hours is necessary to stimulate gonadal development. Under natural lighting conditions in Stuttgart (48°46' N), a photoperiod of 13 h is reached by early April, which fits well with the finding that the majority of animals kept under LD_{nat} had well-developed gonads by the end of April. Nevertheless, these animals showed a rather variable timing of gonadal development, ranging from early January until late April. This is most likely the result of two processes, first an endogenous mechanism that induces gonadal recrudescence without any photoperiodic information while the animals are still in their hibernation burrows, and second a direct stimulatory effect of long photoperiods.

The second part of the thesis examined a possible role of the circadian system in the synchronization process of the circannual clock. This study provides the first detailed analysis of the temporal relationship between seasonal cycles of reproduction and body weight and seasonal changes of two circadian parameters, i.e., locomotor activity and 6-sulphatoxymelatonin (aMT6s) excretion, in individual animals kept under natural light conditions. The results demonstrate a characteristic pattern of locomotor activity and aMT6s excretion observed around the summer solstice, i.e., from mid-May to mid-July. Locomotor activity was characterized by a high level of activity and an early onset of activity. Seasonal changes in aMT6s and in the pattern of locomotor activity were only loosely related to changes in the reproductive status of the animals. Instead, they correlated well with the period of the annual cycle during which the animals are sensitive to short days (Saboureau et al., 1999) and may thus reflect a specific state of the circadian pacemaker system.

2

Einleitung

2.1 Zur Biologie des Europäischen Feldhamsters

Die Hamsterspezies werden innerhalb der Ordnung der *Rodentia* (Nagetiere) zur Familie der *Cricetidae* (Wühler) zusammengefasst und weiterhin zur Unterfamilie *Cricetinae* (Eigentliche Wühler) und zur Gattungsgruppe *Cricetini* (Hamster) gerechnet (Stricker, 1999; Nechay, 2000). Der Feldhamster *Cricetus cricetus* ist der einzige Vertreter der Gattung *Cricetus* (Großhamster). Er zeigt den für alle Hamsterspezies typischen gedrungenen Habitus mit einem kurzen Schwanz und ist ungefähr meerschweinchengroß. Das Fell ist außergewöhnlich bunt (Abb. 1): Die Haare des Rückenfells sind verschieden gefärbt, so dass es insgesamt gelb-, rot- oder graubraun wirkt, was individuell variabel sein kann. Der Schwanz ist meist deutlich heller, da die dunklen Fellanteile fehlen. Die Bauchseite ist komplett schwarz gefärbt. Gelblich-weiße Flecken befinden sich an Wangen, Schultern und Achseln und schneeweißes Fell an den Pfotenoberseiten, an der Schnauze, unter dem Kinn und bei einigen Tieren westlicher Populationen auch auf der Brust (Niethammer, 1982).



Abb. 1: Adulter Feldhamster

Es treten mehrere Farbspiele auf, wobei das am häufigsten beschriebene Melanismus ist (Sulzer, 1774; Niethammer, 1982; Kayser und Stubbe, 2000). Mithilfe der großen Backentaschen kann der Feldhamster Futter in seine unterirdischen Baue bringen und Vorräte anlegen (hamstern). Die paarigen Flankendrüsen, die durch einen kurzen schwarzen Strich im Fell gut erkennbar sind, und die Nabeldrüse produzieren Talg (Niethammer, 1982) und dienen der Reviermarkierung (Eibl-Eibesfeldt, 1953).

2.1.1 Lebensweise

Der Feldhamster ist ein typischer Bewohner von Steppenlandschaften, die in der Zwischenzeit größtenteils in Ackerland umgewandelt wurden. Interessanterweise kommt er auf den im ursprünglichen Zustand erhaltenen Steppenlandschaften in geringeren Dichten als auf Ackerland vor, was ihn als Kulturfolger kennzeichnet (Nechay, 2000). Greifvögel und andere Karnivoren sind die natürlichen Feinde der Feldhamster. Als Bewohner der nördlichen gemäßigten Breiten ist das Habitat des Feldhamsters stark durch saisonale Schwankungen in Temperatur, Niederschlag und Nahrungsverfügbarkeit gekennzeichnet. Das Futter besteht überwiegend aus grünen Pflanzenteilen, stärkehaltigen Samen und Knollen, Invertebraten und kleinen Vertebraten und korreliert in seiner Zusammensetzung mit der Jahreszeit (Karaseva, 1962; Górecki und Grygielska, 1975; Niethammer, 1982). Feldhamster sind überwiegend nacht- und dämmerungsaktiv, allerdings mit einem beachtlichen Anteil Tagaktivität, der ebenfalls im Jahresverlauf variiert (Wendt, 1989, 1990; Wollnik et al., 1991). In Anpassung an die saisonalen Variationen in der Umwelt ist die Reproduktionszeit des Feldhamsters im Allgemeinen auf die Monate April bis August beschränkt, wenn die Nahrungsverfügbarkeit am besten ist und die Temperaturen im Bereich der Thermoneutralzone liegen (Petzsch, 1936; Karaseva, 1962; Vohralik, 1974; Ruzic, 1976; Nechay et al., 1977; Krsmanovic et al., 1984; Nechay, 2000). Die Dauer der Tragzeit beträgt im Allgemeinen 17 – 20 Tage (Petzsch, 1952; Vohralik, 1974). Insgesamt kann ein Weibchen in günstigen Jahren bis zu 4 Würfe mit durchschnittlich 8 Jungtieren haben (Vohralik, 1974; Nechay et al., 1977; Nechay, 2000). Die Frage, ob die Tiere noch im Geburtsjahr geschlechtsreif werden können, ist in der Literatur umstritten (Nechay, 2000). Neueste Untersuchungen zeigen, dass Zeitpunkt und Alter der Geschlechtsreife entscheidend von der Jahreszeit der Geburt der Jungtiere abhängen: Tiere, die früh in der Reproduktionsphase geboren werden, erreichen die Geschlechtsreife schon in einem Alter von etwa einem Monat, während Tiere, die spät im Jahr geboren werden, erst im nächsten Frühjahr, also im Alter von mehreren Monaten, geschlechtsreif sind (Kirm et al.,

2002; Kirn und Wollnik, 2003). Auch andere physiologische Parameter, wie das tägliche Aktivitätsmuster und die Produktion des Hormons Melatonin, zeigen, dass die Ontogenese jahreszeitenspezifisch abläuft (Amann, 2001; Monecke et al., 2001).

Feldhamster leben in unterirdischen Bauen, die typischerweise mehrere Meter lang sind, eine Tiefe von 0,5 – 2 m haben und mehrere Jahre genutzt werden. Ihre Komplexität und Tiefe hängen unter anderem vom Alter und Geschlecht des Tieres ab und von der Jahreszeit, in der sie genutzt werden. Winterbaue sind tiefer als Sommerbaue, Weibchen haben verzweigtere Baue als Männchen und Jungtiere haben primitivere Baue als Alttiere (Eisentraut, 1928; Grulich, 1981). Da Feldhamster Einzelgänger sind (Eibl-Eibesfeldt, 1953), wird jeder Bau nur von einem Tier bewohnt, lediglich primitive Fluchtbaue, die zusätzlich angelegt werden, werden von benachbarten Tieren gemeinsam genutzt (Karaseva, 1962). Der typische Bau besteht aus einer Wohnkammer, einer oder mehreren Vorratskammern, in die das ganze Jahr über Vorräte eingetragen werden, einer Müll- und Fäkalienkammer und mindestens 2 Ausgängen. Insbesondere bei Bauen von Weibchen mit Jungen gibt es oft als Fluchthilfe mehrere Fallröhren von der Oberfläche (Eisentraut, 1928; Grulich, 1981). Im Herbst werden in der Regel 1 – 2 kg Getreide, Sonnenblumensamen oder Kartoffeln als Wintervorrat eingetragen (Nechay et al., 1977; Nechay, 2000).

Im nahrungsarmen kalten Winter stopfen die Feldhamster die Baueingänge zu und halten Winterschlaf (Nechay, 2000). Der Winterschlaf gliedert sich in normotherme Phasen, während derer die Tiere von den Vorräten fressen oder kurz den Bau verlassen (Eisentraut, 1928), und in hypotherme Phasen, während derer die Körpertemperatur drastisch absinkt und mit der Umgebungstemperatur korreliert (Gubbels et al., 1989; Wollnik und Schmidt, 1995; Waßmer und Wollnik, 1997). In solchen Torporphasen sind alle lebensnotwendigen Stoffwechselfunktionen auf ein Minimum reduziert, um Energie zu sparen. Die Torporphasen können etwa 4 – 7 Tage dauern und werden dann wieder durch mehr oder weniger lange normotherme Phasen beendet. In Abhängigkeit von Alter und Geschlecht verschwinden die ersten Tiere Ende August und Anfang September in ihren Winterbauen, die letzten Ende Oktober: Zuerst die alten Männchen, dann die alten Weibchen und zum Schluss die Jungtiere (Karaseva, 1962; Ruzic, 1976). Die Reihenfolge beim Verlassen des Winterbaus ist ähnlich: Zuerst die alten Männchen (ab Mitte Februar), dann allerdings die jungen Männchen und zum Schluss die Weibchen und sehr spät geborene Jungtiere (Mitte April) (Ruzic, 1976; Bihari, 2002). Das Gewicht der Feldhamster wird vor dem Winterschlaf reduziert. Ein niedrigeres

Gewicht führt zu einer geringeren Körperoberfläche und damit zu einem reduzierten Wärmeverlust und trägt so zur Energieersparnis bei. Im Frühjahr und Sommer nehmen die Tiere wieder zu. Dabei ist die Zunahme in jedem Jahr größer als die Abnahme, so dass das Gewicht eines Feldhamsters im Laufe seines Lebens immer mehr ansteigt (Masson-Pévet et al., 1994b). Adulte Männchen sind mit einem altersabhängigen Gewicht von 300 bis 800 g und mehr deutlich schwerer als gleichaltrige adulte Weibchen, die etwa zwischen 250 und 600 g wiegen (eigene Beobachtungen und (Masson-Pévet et al., 1994b; Nechay, 2000)).

2.1.2 Verbreitung und Lebensraum

Das gegenwärtige Verbreitungsgebiet des Feldhamsters ist auf einen Gürtel zwischen 45 - 60° N und 5 - 95° E in der gemäßigten westlichen Paläarktis beschränkt. Dort besiedelt er primär fruchtbare Steppengebiete mit trockenen, tiefgründigen Löss- und Lehmböden und kontinental geprägtem Klima. Das Verbreitungsgebiet wird östlich ungefähr durch den Fluss Jenissei in Sibirien und westlich ungefähr durch den Rhein begrenzt, wobei es kleinere Populationen auch im Elsass, in Belgien und den Niederlanden gibt (Abb. 2).

Die Populationsdichte variiert stark im Verbreitungsgebiet: Während es im westlichen Rand (Frankreich, Belgien, Niederlande, Österreich und Deutschland) nur noch inselartige Vorkommen gibt und der Feldhamster durch die Berner Konvention, Anhang II, und Flora-Fauna-Habitat-Richtlinien, Anhang IV, des Europarates streng geschützt ist, gilt er im östlichen Bereich (Jugoslawien, Kasachstan, Moldawien, Russland, Ukraine, Ungarn) trotz rückläufiger Bestände immer noch als großer Getreideschädling und wird dort bekämpft oder wegen seines Fells gejagt (Nechay, 2000). Der Schwerpunkt der Verbreitung liegt damit eindeutig in Osteuropa und Asien, vermutlich wegen des kontinentaleren Klimas.

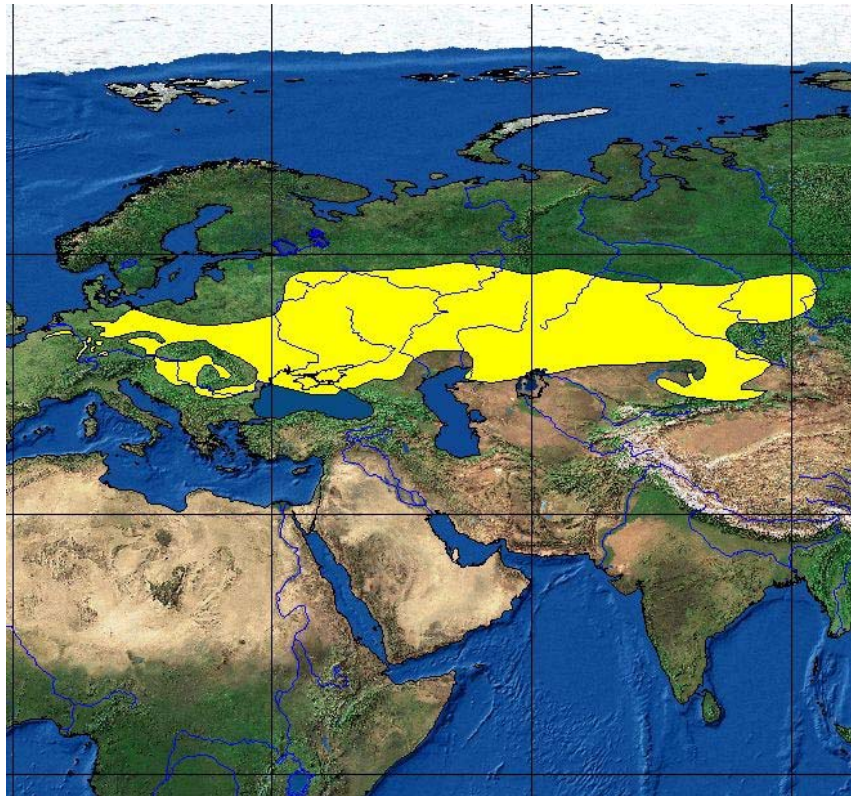


Abb. 2: Aktuelles Verbreitungsgebiet des Feldhamsters (*Cricetus cricetus*). Karte aus der “European Quaternary Mammalia Database“ des Paläontologischen Instituts der Universität Bonn (<http://www.paleontology.uni-bonn.de/euquam/EUQUAMpg.html>) nach Quellen von: Niethammer & Krapp (1978, 1982 & 1989), Stubbe & Krapp (1992), Corbet & Hill (1978), Bobrinski & Kusnetzow (1965), Heptner et al. (1966) in 3 Bänden und Panteleev (1980).

Die prähistorische und historische Verbreitung des Feldhamsters kann nicht lückenlos rekonstruiert werden. Erste fossile Funde aus der Familie Cricetidae stammen aus dem Pliozän (5,1 Mio. bis 2 Mio. Jahre vor heute). *Cricetus cricetus* wurde zum ersten Mal im Pleistozän (2 Mio. bis 10000 Jahre vor heute) nachgewiesen. Das damalige Verbreitungsgebiet entsprach etwa dem heutigen, war aber vor allem Richtung Südwesten (Nordspanien, Westfrankreich, Italien) noch etwas weiter ausgedehnt. Auch in Großbritannien war der Feldhamster offensichtlich verbreitet (Werth, 1936; Nechay, 2000). Feldhamster waren sehr anpassungsfähig, denn sie kamen in diesem Gebiet sowohl während als auch zwischen den Eiszeiten vor. Subfossile Funde aus dem Holozän (Beginn vor ca. 10000 Jahren) zeigen sogar, dass der Feldhamster trotz zunehmender Bewaldung dieses Gebietes während der Postglazialzeit nicht abgewandert ist (Werth, 1936).

Ab da verliert sich allerdings die Spur des Feldhamsters für lange Zeit. Fest steht, dass es zum Ende des 19. Jahrhunderts eine bemerkenswerte Migration von Feldhamstern aus Osteuropa nach Westeuropa gegeben haben muss, die in der 11. Ausgabe von Brehms Tierleben (Brehm, 1914) eindrucksvoll mit Beispielen aus Frankreich, Belgien und Deutschland belegt wird. Feldhamster wurden 1885 sogar fernab dem heutigen Verbreitungsgebiet in der Nähe von Paris gesichtet. Der Feldhamster muss offensichtlich in Westeuropa bis ca. 1870 relativ unbekannt oder gar ausgestorben gewesen sein, denn er wird in Brehms Tierleben (Brehm, 1914) als „Einwanderer aus den Steppengebieten Asiens“ oder als „Sprössling der Tartarei“ bezeichnet. Aufgrund der seinerzeit andauernden starken Wanderbewegung und zunehmenden Besiedlung wurde sogar von Angaben zur Verbreitung in Deutschland abgesehen. Nichtsdestotrotz gibt es vor dieser Zeit einzelne Berichte über den Hamster, die in einer Studie von Sulzer (1774) zusammengefasst sind. Die älteste dort zitierte Abhandlung stammt offensichtlich aus der Mitte des 13. Jahrhunderts von dem Regensburger Bischof Albertus Magnus. Der Feldhamster muss also spätestens seit dieser Zeit bis zum Ende des 18. Jahrhunderts im Gebiet des heutigen Deutschlands bekannt gewesen sein.

2.1.3 Populationsdynamik und Gefährdung

Im Wesentlichen entscheiden Mortalität und Geburtenrate über die Größe und das Fortbestehen einer Population. Bei bestimmten Arten, wie z. B. dem Feldhamster, kann es unter besonders guten Wetterbedingungen (regenarm, warm) zu pestartigen Ausbrüchen der Population kommen. Spätestens seit Ende des 19. Jahrhunderts bis vor etwa 30 Jahren wurden solche Hamsterpestjahre auch im wiederbesiedelten Westeuropa in regelmäßigen Abständen beobachtet. In diesen Jahren steigt die Geburtenrate durch zusätzliche Würfe sprunghaft an und gleichzeitig nimmt die Mortalitätsrate ab. Diese regelmäßig auftretenden, natürlichen Hamsterpesten wurden außerdem durch die vom Menschen verursachten Veränderungen der Lebensräume potenziert: Wasserstandsregulierungen der Flüsse, Grundwasserabsenkungen und Veränderungen in der Agrartechnologie begünstigten das Überleben der Feldhamster zusätzlich (Nechay et al., 1977). Infolgedessen vermehrten sich in einigen Jahren die Populationen in typischen Hamsterregionen explosionsartig, verursachten so enorme Ernteschäden (bis zu 100 % (Jüttner, 1957)) und besiedelten zusätzlich neue Gebiete, in denen sie bis dahin unbekannt waren. Möglicherweise ist die Wiederbesiedlung Westeuropas auch auf einen ähnlichen Vorgang zurückzuführen; dafür spricht der erstaunliche Synchronismus der Hamsterpestjahre innerhalb Europas und Russlands (Nechay et al., 1977).

Für den heutigen dramatischen Rückgang der Populationen in Westeuropa seit den 80er Jahren werden hauptsächlich Gründe diskutiert, die die Mortalität innerhalb der Populationen erhöhen könnten. Die fortschreitende Intensivierung der Landwirtschaft und ein drastischer Wandel im Fruchtartenspektrum werden als Hauptfaktoren diskutiert (Backbier et al., 1996). Das schnelle, großflächige und nahezu verlustfreie Abernten im Herbst führt zu einem kompletten Verlust der Deckung und außerdem dazu, dass die Tiere nicht genügend Wintervorräte eintragen können, was insgesamt zu einer hohen Mortalität führt. Als viel gravierender werden allerdings die zunehmende Zersiedlung und Zerschneidung der Landschaft und der enorme Flächenverbrauch eingestuft (Backbier et al., 1996; Nechay, 2000; Kayser und Stubbe, 2002). Das Einstellen der intensiven Hamsterbejagung, wie es noch bis in die 80er Jahre in Deutschland üblich war, hatte dagegen keinen merklichen positiven Einfluss auf die Populationsdichten, die Bestände blieben weiterhin rückläufig (Kayser und Stubbe, 2002). Auch verschiedene Rückstände aus Pestiziden (chlorierte Kohlenwasserstoffe, Schwermetalle), denen der Feldhamster als typischer Bewohner der Agrarlandschaften besonders stark ausgesetzt ist, konnten im Gewebe von Feldhamstern nur in Mengen nachgewiesen werden, die nicht als gesundheitsschädlich für die Tiere eingestuft werden (Kayser et al., 2001, 2003), und damit nicht wesentlich zur Erhöhung der Mortalität beitragen.

Im Vergleich zu anderen Arten hat der Feldhamster allerdings schon von Natur aus eine relativ geringe Lebenserwartung. Bei seiner Größe liegt die Vermutung nahe, dass er eine ähnliche Lebenserwartung wie das etwa gleichgroße Hausmeerschweinchen (*Cavia aperea porcellus*) (etwa 6 – 8 Jahre) (Schneider, 1968; Behrend, 2003) oder der einheimische Igel (*Erinaceus europaeus*) (etwa 10 Jahre) (Grizmek, 1967) hat. Die maximale Lebenserwartung des Feldhamsters wird allerdings meistens mit nur 4 Jahren angegeben (Karaseva, 1962; Vohralik, 1975; Niethammer, 1982; Ernst et al., 1989). Neueste Daten berichten sogar von maximal 3 Jahren und einem durchschnittlichen Lebensalter von 1 Jahr (Kayser et al., 2003). Im Labor liegt die maximale Lebenserwartung ebenfalls bei nur 3 und die durchschnittliche etwa bei 1,5 – 2 Jahren (eigene Beobachtungen). Damit entspricht die Lebenserwartung des Feldhamsters eher der des viel kleineren Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) oder des Dsungarischen Zwerghamsters (*Phodopus sungorus*), die beide eine Lebenserwartung von 1,5 – 2 Jahren haben (Stricker, 1999). Die Ursache für diese außerordentlich niedrige Lebenserwartung des Feldhamsters ist unklar. Ein Grund könnte die – auch im Vergleich zu anderen Nagetieren - ungewöhnlich hohe Neigung zu Krebserkrankungen sein (Ghadially und Illman, 1965; Mohr et al., 1973; Ernst et al., 1989; Kaup et al., 1990; Brandes et al., in press).

Die derzeitige geringe Lebenserwartung könnte auch eine Ursache für den anhaltenden Rückgang der Feldhamsterpopulationen sein. Daneben spielen möglicherweise andere unbekannte endogene Faktoren eine wesentliche Rolle, die vor allem auf die Geburtenrate Einfluss haben, aber bisher weitgehend bei der Ursachenforschung außer Acht gelassen wurden. So ergab die Berechnung von zukünftigen Hamsterpestjahren mit einem Modell zur Populationsdynamik für die Vorhersage von Nagetierpesten (Leirs et al., 1997) zwar regelmäßige Hamsterpestjahre für Zentraleuropa und damit eine stabile Überdauerung der dortigen Population, allerdings das Aussterben der Westeuropäischen Populationen innerhalb von 100 Jahren, ohne dass Umwelteinflüsse dafür verantwortlich gemacht werden könnten (Leirs, 2002). Die Modellrechnung basierte auf demographischen Literaturdaten sowie unveröffentlichten Beobachtungen der Teilnehmer des „10th Meeting of the International Hamsterworkgroup“. Lediglich die in westeuropäischen Populationen um 1 geringere Wurfanzahl der Weibchen pro Jahr (2 – 3 verglichen mit 3 – 4) führte zu diesem Ergebnis. Umwelteinflüsse wie Qualität, Quantität und Konnektivität des Habitats, die oft als Rückgangsursachen angesehen werden, haben aber lediglich einen Einfluss auf die Mortalität innerhalb einer Population, nicht jedoch auf die Anzahl der Würfe pro Jahr (Leirs, 2002). Möglicherweise konnten die Populationen Westeuropas noch nie aus eigener Kraft bestehen (Leirs, 2002), sondern waren immer auf Zuwanderungen aus dem Osten angewiesen, so dass extreme Schwankungen in der Populationsdichte und sogar das zeitweise Aussterben in Westeuropa als Randgebiet der Verbreitung zwar durchaus normal sind, aber die zunehmende Flächenzerschneidung ein langfristiges Überleben der Feldhamster in Westeuropa unmöglich macht.

Die geringe Wurfanzahl ist wahrscheinlich eine Folge des ausgesprochen späten Erwachens aus dem Winterschlaf in den westlichen Populationen. In Sachsen-Anhalt verlässt ein Großteil der Feldhamster beispielsweise sogar erst im Mai oder Anfang Juni die Winterbaue, also kurz bevor die Tage wieder kürzer werden und die erneuten Wintervorbereitungen beginnen, so dass die meisten Weibchen nur Zeit für einen Wurf im Jahr haben (Weidling zitiert in (Nechay, 2000)). Normalerweise beginnt die Reproduktionszeit bereits im April (Petzsch, 1936; Karaseva, 1962; Vohralik, 1974; Ruzic, 1976; Nechay et al., 1977; Krsmanovic et al., 1984; Nechay, 2000). Die kurze Reproduktionszeit der westeuropäischen Populationen kann nicht mit einem Effekt der unterschiedlichen geographischen Lage begründet werden. Abweichungen in der Reproduktionszeit und anderen physiologischen Parametern verschiedener Populationen einer Art sind bei saisonal reproduktiven Spezies nur bezüglich

der Breitengrade bekannt (Daan und Aschoff, 1975; Müller, 1978; Dark et al., 1983). Allerdings liegt das Areal in Sachsen-Anhalt mit etwa 52° N etwa in der Mitte der Nord-Süd-Ausdehnung des Verbreitungsgebietes, so dass es eine andere Ursache geben muss. Eventuell ist das maritimere Klima für den verspäteten Beginn der Reproduktionszeit verantwortlich (Leirs, 2002). Da der Beginn der Reproduktionszeit und damit das Ende der Winterschlafsaion beim Feldhamster von einer so genannten inneren Jahresuhr gesteuert wird (Masson-Pévet et al., 1994b), könnte man auch vermuten, dass unbekannte Störungen oder Veränderungen dieser Jahresuhr für das verspätete Erwachen verantwortlich sind. Ein Anliegen dieser Arbeit war daher, die saisonale Rhythmik des Europäischen Feldhamsters anhand von physiologischen und verhaltensbiologischen Parametern unter definierten Bedingungen näher zu charakterisieren.

2.1.4 Aktuelles

Die Präferenz für Ackerflächen erweist sich trotz günstiger Lebensbedingungen immer mehr als Nachteil für den Feldhamster. Weil geschützte Spezies nicht auf intensiv genutzten Ackerflächen vermutet werden, wird Ackerland als potentiell Bauland ausgewiesen, so dass die Feldhamster oft erst im letzten Moment entdeckt werden. Damit gerät der Feldhamsterschutz oft in einen politischen Konflikt mit teilweise ehrgeizigen Bauprojekten, Arbeitsplätzen und anderen Interessen. In vielen Fällen wurde daher aus Mangel an Alternativen in den vergangenen Jahren, trotz des strengen Schutzes durch die Flora-Fauna-Habitat-Richtlinien und die Berner Konvention, häufig eine Umsiedlung einer Feldhamsterpopulation geplant oder durchgeführt, um die Bebauung nicht zu gefährden. Eine Umsiedlung verursacht allerdings enorme Kosten, speziell wenn sie zusätzlich von einem Zuchtprogramm oder wissenschaftlichen Untersuchungen begleitet wird (Tab. 1):

Trotz dieses hohen finanziellen Einsatzes, der Berücksichtigung der Erfahrungen bei anderen Spezies (Jordan, 2001) und den intensiven Bemühungen der durchführenden Organisationen ist ein Erfolg allerdings fraglich, weil viel zu wenig über den Feldhamster bekannt ist. Manche Autoren halten daher eine Umsiedlung von Feldhamstern derzeit sogar für unmöglich (Muschketat und Klamroth, 1990). Erste Berichte wissenschaftlich begleiteter Umsiedlungsversuche von Feldhamstern sind kürzlich erschienen, sie beleuchten aber nur die

ökologischen Faktoren und den Umsiedlungserfolg nach einem Jahr (de Vries, 2002; Mammen et al., 2002). Die Planung und die Erfolgsaussichten von diversen Schutzmaßnahmen könnten sicher optimiert und dabei möglicherweise die Kosten gesenkt werden, wenn mehr über die Physiologie des Feldhamsters bekannt wäre. In dieser Arbeit soll die Physiologie der Feldhamster aus chronobiologischer Perspektive näher untersucht werden.

Betrag	Aktion	Ort	Zeitungsbericht
5.000.000 € (davon 1.275.000 € vom Land Nordrhein-westfalen)	Zucht- und Wiederansiedlung als Ausgleichsmaßnahme	grenzübergreifendes Industriegebiet Avantis, Aachen / Heerlen	(Ingenrieth, 2001; Witte, 2001; Delonge, 2002; Gillies, 2002; Lange, 2002)
130.000 DM	Kauf einer Ersatzfläche für Feldhamster	Baugebiet Timmerlah-Hopfengarten, Braunschweig	(Jonscher, 2001c, a, b)
64.000 €	Umsiedlung	Baugebiet Geitelde, Braunschweig	(Jonscher, 2003b, a)
13.000 € (25.000 DM)	Umsiedlung	Mercedes Gebrauchwagencenter bei Wiedemar	(Eichstädt, 2001b, a; Körner, 2001; Honnigfort, 2002)
1.000.000 € (8.000 – 10.000 € pro Hamster)	Umsiedlung	Bau einer Arena im Bösfeld, Mannheim	(Goldschmitt, 2002; Jansen, 2002; Tangl, 2002a, b)

Tab. 1: Kostenbeispiele von Hamsterschutzmaßnahmen

2.2 Grundlagen biologischer Rhythmen

2.2.1 Exogene Rhythmen

Die Dynamik unseres Universums beherrscht mehr als alles andere die Lebensbedingungen auf unserer Erde, indem sie der räumlichen Gliederung der Habitate eine zeitliche Strukturierung hinzufügt. Die auffallendsten zeitlichen Veränderungen, die Tiere und Pflanzen bewältigen müssen, sind periodischer Natur und werden durch die Drehung der Erde um ihre Achse, durch ihre Umkreisung der Sonne sowie durch die komplexere Bewegung des Mondes in Relation zu Erde und Sonne generiert. Der erstgenannte astronomische Zyklus resultiert in einen rhythmischen Wechsel von Tag und Nacht, der zweite führt - als Folge der Schiefe der Ekliptik - zum Wandel der Jahreszeiten, der dritte ist verantwortlich für den Wechsel der Mondphasen und Gezeiten. Dabei beträgt die Periodenlänge der Tages- oder diurnalen Rhythmen 24 h, die der Jahres- oder annualen Rhythmen 365 d, die der lunaren Rhythmen 29,5 d und die der tidalen Rhythmen 12 h 25 min. Die Umwelt eines Organismus gestaltet sich damit äußerst variabel, was eine gewisse Flexibilität des Organismus erfordert, um darin bestehen zu können.

2.2.2 Endogene Rhythmen

Die geophysikalischen Zyklen sind für das Überleben eines Organismus insofern von großer Bedeutung, als dass sie ausgeprägte sekundäre Veränderungen, z. B. der Beleuchtungsverhältnisse, des Klimas, der Nahrungsverfügbarkeit und des Wasserstandes hervorrufen. Das komplexe Netzwerk an Selektionsdrücken, das allein aus diesen Variationen entsteht, hat während der Evolution dazu geführt, dass die Organismen viele ihrer Verhaltensweisen wie Nahrungsaufnahme, Aktivität, Reproduktion etc., auf bestimmte Zeiträumen beschränken, so dass sie nur in verschiedene Tageszeiten (Aktivität), Mondphasen (Schwärmen der Maifliege (*Pavilla adusta*)), Tiden (Aktivität) oder Jahreszeiten (Reproduktion, Winterschlaf) fallen. Durch die enge Kopplung mit den geophysikalischen Zyklen sind derartige biologische Rhythmen unter natürlichen Bedingungen relativ konstant.

Darüber hinaus gibt es auch biologische Rhythmen ohne erkennbares exogenes Korrelat. Die Periodenlängen dieser Rhythmen bewegen sich im Bereich von 1 ms (Aktionspotentiale von Nervenzellen) bis hin zu 100 Jahren (Blüte von bestimmten Bambusarten) (Nelson, 1995). Die meisten Rhythmen des zentralen Nervensystems sowie cardiovasculäre und respiratorische Rhythmen können sehr variabel sein, da ihre Frequenzen an die jeweilige Stoffwechselsituation angepasst sind, andere Rhythmen sind dagegen relativ konstant, wie z. B. die Periodenlänge der Östruszyklen von Säugetieren oder der 17 jährige Reproduktionszyklus der 17-Jahreszikade (*Magicalada septemdicem*). Die rhythmische Steuerung von Lebensprozessen ist somit ein weit verbreitetes Prinzip von wichtiger physiologischer und ökologischer Bedeutung.

Während man bei biologischen Rhythmen ohne exogenes Korrelat mit Sicherheit davon ausgehen kann, dass sie endogen gesteuert werden, kann man das nicht ohne Weiteres von den Rhythmen annehmen, die synchron mit exogenen Schwingungen ablaufen. Zwei Bedingungen müssen erfüllt sein, damit zweifelsfrei bewiesen ist, dass ein Rhythmus endogen gesteuert ist:

1. Der Rhythmus muss ohne Umwelteinflüsse unter konstanten Bedingungen bestehen bleiben.
2. Die Periodenlänge des Rhythmus muss unter konstanten Bedingungen etwas von der Periodenlänge der rhythmischen Umgebung abweichen. Nur so kann man zweifelsfrei ausschließen, dass andere unentdeckte Umweltfaktoren einen synchronisierenden Einfluss ausüben.

Den ersten Nachweis einer endogenen Tagesrhythmik erbrachte der französische Astronom de Mairan im Jahr 1729 (de Mairan, 1729), als er feststellte, dass die tagesperiodischen Blattbewegungen der heliotropen *Mimosa pudica* auch in konstanter Dunkelheit bestehen bleiben. Gut 100 Jahre später im Jahre 1832 hat de Candolle (zitiert in (Kohler, 1998)) für diese Pflanze gezeigt, dass die Periodenlänge der Blattbewegung geringer als 24 h ist. Inzwischen sind solche von Umwelteinflüssen freilaufenden Rhythmen für eine Vielzahl von Pflanzen und Tieren bekannt. Die Abweichung der endogenen Periodenlänge vom jeweiligen geophysikalischen Pendant ist gering aber merklich und beträgt im Allgemeinen bis zu

ca. $\pm 10\%$ (Nelson, 1995). Aufgrund dieser geringfügigen Abweichung wurden die Begriffe circadian (ungefähr ein Tag), circannual (ungefähr ein Jahr), circalunar (ungefähr ein Mondzyklus) und circatidal (ungefähr eine Tide) für die entsprechenden biologischen Rhythmen endogenen Ursprungs eingeführt.

2.2.3 Synchronisation biologischer Rhythmen

Unter natürlichen Bedingungen sind Abweichungen vom geophysikalischen Rhythmus bzw. ein Freilauf der biologischen Rhythmen nicht zu beobachten, was auf einen synchronisierenden Einfluss der Umwelt auf die biologischen Uhren schließen lässt. Umweltparameter, die zur Synchronisation der endogenen Rhythmen führen, werden als Zeitgeber bezeichnet (Aschoff, 1954). Als effektivste Zeitgeber gelten die Umweltrhythmen, die unmittelbar mit den astronomischen Zyklen zusammenhängen. So ist der durch die Erdrotation erzeugte Wechsel von Tag und Nacht für die circadianen Rhythmen der primäre Zeitgeber. Der wechselnde Anteil von Tageslicht am 24 h Tag (Photoperiode), der durch die Drehung der Erde um die Sonne hervorgerufen wird, ist dagegen für die Synchronisation circannualer Rhythmen verantwortlich. Neben diesen photischen Zeitgebern gibt es noch eine Vielzahl so genannter nicht-photischer Faktoren, z. B. die tages- oder jahreszeitlichen meteorologischen Schwankungen, insbesondere in der Temperatur oder der Luftfeuchtigkeit, die zwar zur Synchronisation biologischer Rhythmen beitragen, aber nicht so verlässlich sind, weil sie durch sekundäre Faktoren beeinflusst sein können. Die Rhythmen der belebten Umwelt, die durch eine ganze Reihe abiotischer Zeitgeber synchronisiert werden, dienen ihrerseits wiederum als Zeitgeber für andere Organismen. Aus ökologisch-physiologischer Sicht sind hier die Nahrungsverfügbarkeit oder Räuber-Beute-Beziehungen zu nennen (Daan, 1981). Außerdem spielen soziale Komponenten eine Rolle (Honrado und Fleming, 1996; Rajaratnam und Redman, 1999). Den Synchronisationsprozess eines endogenen Rhythmus auf einen Zeitgeber nennt man „*entrainment*“ (aus dem Englischen für „Mitnahme“ oder Synchronisation).

2.2.4 Adaptiver Wert endogener Rhythmen

Biologische Rhythmen reflektieren die genetisch determinierte Anpassung des Organismus an seine oszillierende Umgebung. Für den zugrundeliegenden Mechanismus wird der Begriff „innere Uhr“ verwendet, denn er ermöglicht eine Zeitmessung. Die Steuerung endogener

physiologischer und biochemischer Prozesse erhält damit eine zeitliche Komponente – die Grundvoraussetzung für deren effizienten Ablauf. Eine zeitliche Abstimmung von Verhaltensweisen auf eine oszillierende Umwelt erfordert dagegen nicht zwangsläufig eine innere Uhr und könnte auch rein passiv ablaufen. Dennoch bietet das Vorhandensein einer inneren Uhr auch hier evolutive Vorteile. Ein Rhythmus (auch ein Umweltrhythmus) zeichnet sich durch die regelmäßig wiederkehrenden Ereignisse einer fortwährenden Oszillation aus und damit durch die genaue Vorhersehbarkeit der zukünftigen Ereignisse. Die Interaktion von stabiler Eigenschwingung der inneren Uhr und ihrer Synchronisationsfähigkeit ermöglicht es, die lokale Zeit der Umgebung präzise wahrzunehmen und damit periodisch wiederkehrende Umweltereignisse wie Nacht, Winter, Flut und Vollmond vorherzusehen, so dass sich der Organismus darauf vorbereiten kann.

Ein gutes Beispiel für die Bedeutung der endogenen Zeitmessung ist die Synchronisation von Mutter- und Jungtieren bei Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*). Die Mutter sucht nur einmal am Tag, jeweils zur gleichen Uhrzeit, den Bau mit den Jungtieren zum Säugen auf. In Antizipation auf diesen kurzen Besuch zeigen die Jungtiere täglich kurz vorher eine gesteigerte Aktivität. Jungtiere, die den Säugetermin verpassen, verhungern (Hudson und Distel, 1989). Da der Bau zwischen 2 Säugeterminen fest verschlossen wird und die Jungen ohne Information über die Tageszeit leben, ist eine innere Tagesuhr erforderlich. Auch die Überdauerung unwirtlicher Jahreszeiten durch Winterschlaf wäre ohne eine endogene Uhr nicht denkbar. Zum einen müssen sich die Tiere durch das Anlegen von Vorräten - sei es innerhalb des Körpers als Fettreserven oder wie beim Feldhamster in Vorratskammern im Bau - auf die Winterschlafsaion vorbereiten, bevor das Nahrungsangebot im Herbst nachlässt und die Temperaturen absinken. Zum anderen ist der präzise Zeitpunkt für das Ende des Winterschlafes lebenswichtig und nur durch das Timing von einer inneren Jahresuhr zu erklären, denn winterschlafende Tiere bewohnen meist Höhlen und sind somit für Monate von den Informationen über Tages- und Jahreszeit abgeschnitten.

2.3 Tagesrhythmen und das circadiane System der Säugetiere

Aufgrund des allgegenwärtigen Rhythmus von Tag und Nacht kommt dem circadianen Rhythmus eine besondere Bedeutung zu. Praktisch alle Lebewesen haben eine interne Kopie des diurnalen Rhythmus entwickelt. So werden das interne und externe Timing tageszeitlicher Abläufe mit Hilfe des circadianen Systems optimiert. Circadiane Rhythmen lassen sich in zahlreichen physiologischen Funktionen und Verhaltensweisen unter konstanten Bedingungen nachweisen, z. B. Nahrungsaufnahme, Enzymaktivitäten, metabolischer Grundumsatz, Körpertemperatur, Zellteilungsrate, Schlaf und viele andere mehr. Besonders gut ist der circadiane Aktivitätsrhythmus untersucht. Auch endokrine Funktionen werden circadian gesteuert. Hier ist vor allem die Sekretion des pinealen Hormons Melatonin zu nennen.

Die endogene Periodenlänge τ (tau) des circadianen Schrittmachers, die man bei Organismen ohne einen täglichen Zyklus von Licht und Dunkelheit (LD) beobachtet, ist eine relativ stabile Größe. Dennoch kann τ auch unter freilaufenden Bedingungen in gewissen Grenzen variabel sein. So führt Dauerlicht mit verschiedenen Lichtintensitäten zu systematischen Veränderungen von τ (Aschoff'sche Regel) (Aschoff, 1960, 1979). Außerdem ist τ von der photoperiodischen Vergangenheit abhängig. Die externe Periode T des Tag-Nacht-Wechsels und die Photoperiode beeinflussen die endogene Periode τ so, dass unter nachfolgenden freilaufenden Bedingungen, d. h. unter Dauerlicht und Dauerdunkel, sogenannte „*after-effects*“ (aus dem Englischen für Folgeeffekte) zu beobachten sind (Pittendrigh und Daan, 1976a).

2.3.1 Neuronale Grundlagen circadianer Rhythmen

Der circadiane Schrittmacher der Säugetiere ist im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) lokalisiert (Klein et al., 1991). Dieses paarige Kerngebiet liegt am ventralen Rand des Hypothalamus, direkt oberhalb des optischen Chiasmus und flankiert die ventrale Spitze des 3. Ventrikels. Der Hypothalamus ist ein evolutionsgeschichtlich altes Hirnareal, das allen höheren Wirbeltieren gemeinsam ist. Die Schrittmacherfunktion des SCN wurde durch

Läsionsexperimente an Ratten und Goldhamstern entdeckt (Moore und Eichler, 1972; Stephan und Zucker, 1972; Rusak, 1977). SCN-läsionierte Tiere zeigen einen vollständigen Verlust der circadianen Organisation von Aktivität, Nahrungsaufnahme, Körpertemperatur und der pinealen Melatoninproduktion. Zudem zeigen die Neurone eines isolierten SCN *in vivo* und *in vitro* circadiane Rhythmen metabolischer und elektrischer Aktivität (Inouye und Kawamura, 1979; Gillette, 1991; Newman, 1991; Schwartz, 1991). Transplantationsexperimente lieferten jedoch den überzeugendsten Beweis: SCN-läsionierte, arhythmische Hamster zeigten nach Implantation von SCN Gewebe aus Föten, deren endogene Periodenlänge τ mutiert war, nicht nur wieder eine circadiane Rhythmik, sondern sogar die veränderte Periodenlänge des Spendertieres (Ralph et al., 1990; Menaker und Vogelbaum, 1993).

Die meisten efferenten Projektionen ziehen vom SCN in die subparaventriculäre Zone (SPVZ), ein Gebiet zwischen SCN und dem weiter dorsal gelegenen hypothalamischen Nukleus paraventricularis (PVN). Außerdem projiziert der SCN in geringerem Ausmaß in verschiedene Gebiete des Hypothalamus, des basalen Vorderhirns und des Thalamus (Watts, 1991; Moore, 1996). Von besonderer Bedeutung sind die Projektionen zum PVT, denn sie erlauben dem SCN einen fast direkten Einfluss auf die Aktivität, weil die Efferenzen des PVT verschiedene Strukturen des mesolimbisch-corticalen Komplex innervieren, der als Hauptzentrum für die Initiierung und Aufrechterhaltung lokomotorischer Aktivität (Pévet et al., 1996) gilt.

2.3.2 Synchronisation und Photosensitivität des circadianen

Systems

Die zuverlässige Erkennung der lokalen Zeit erfordert eine stabile Phasenbeziehung zwischen dem endogenen Schrittmacher und den tagesperiodischen Umweltreizen, d. h. eine Synchronisation. Obwohl verschiedene Zeitgeber für das circadiane System beschrieben wurden, ist der tägliche Licht-Dunkel-Zyklus zweifelsohne der stärkste von ihnen (Aschoff, 1954). Das anatomische Substrat für die Übertragung photischer Reize auf das circadiane System bilden in allen bisher untersuchten Säugetieren zum einen eine direkte photische Projektion zwischen Retina und SCN, der retinohypothalamische Trakt (RHT) (Moore und Lenn, 1972), und zum anderen eine indirekte Projektion über das *intergeniculate leaflet* (IGL) und den geniculohypothalamischen Trakt (GHT) (Card und Moore, 1991). Der SCN ist in

einen dorsomedialen und einen ventrolateralen Teil gegliedert; die Neurone des RHT und des GHT enden beide im ventrolateralen Teil (Leak et al., 1999). Läsionsexperimente zeigen, dass der RHT für die Synchronisation circadianer Rhythmen auf einen LD-Wechsel unerlässlich ist (Johnson et al., 1988). Der IGL ist dagegen nicht unbedingt erforderlich, hat aber einen signifikanten Einfluss auf die Stärke der Reaktion des circadianen Systems auf tonische und phasische Effekte von Licht und spielt wahrscheinlich bei der Übertragung von Informationen über die Lichtintensität eine Rolle (Pickard et al., 1987).

Theoretisch kann die Synchronisation eines endogenen Rhythmus entweder durch eine Anpassung seiner Periode ($\Delta\tau$), d. h. durch eine Geschwindigkeitsveränderung, oder durch eine einmalige Korrektur seiner Phase ($\Delta\phi$) erreicht werden (Daan, 1985). In der ersten These erfolgt eine tonische Antwort des Schrittmachers auf kontinuierliche Wahrnehmung der Stärke der Lichtintensität. Die Frequenz wird durch alternierendes Beschleunigen und Abbremsen in Abhängigkeit von den täglichen Schwankungen der Lichtintensität angepasst. In Anlehnung an die physikalische Nomenklatur der Oszillatoren-Theorie wird diese Form der Synchronisation „parametrisches *entrainment*“ genannt. Unter „nicht-parametrischem *entrainment*“ versteht man dagegen, dass der Schrittmacher phasisch reagiert, d. h. die Phasenlage der Schwingung wird ein- bis zweimal am Tag abrupt neu justiert.

Eine stabile Synchronisation erfordert demnach entweder, dass τ eine Funktion der Lichtintensität ist, oder dass die Phase ϕ (phi) eines jeden endogenen Zyklus derart verschoben wird, dass die Differenz zwischen der endogenen Periodenlänge τ und der des Zeitgebers T ausgeglichen wird (Daan, 1985).

$$\tau = f(\text{Lichtintensität})$$

parametrisch

tonisch

$$\Delta\phi(\phi) = \tau - T$$

nicht-parametrisch

phasisch

Der prominenteste Vertreter der Theorie des parametrischen *entrainments* war Jürgen Aschoff und der des nicht-parametrischen Colin Pittendrigh. Für beide Konzepte gibt es gute Gründe: Einerseits ist unter Dauerlicht τ von der Stärke der Lichtintensität abhängig (Aschoff, 1960, 1979), andererseits ist eine phasische Reaktion, also eine Phasenverschiebung, auch durch einen einzigen kurzen Lichtpuls zu erreichen (Pittendrigh und Daan, 1976).

Das parametrische Modell geht davon aus, dass Licht nicht nur einen ständigen Einfluss auf τ hat, sondern auch auf andere Parameter des zugrunde liegenden Rhythmus, z. B. auf die Wellenform und den Mittelwert, um den die Oszillation schwingt. Die Oszillation interagiert mit einem endogenen Grenzwert und induziert Aktivität, solange die oszillierende Variabel oberhalb dieses Grenzwertes liegt. Allerdings ist der endogene Grenzwert biologisch nicht interpretierbar und lässt sich daher nicht messen, weshalb dieses Modell in der Praxis kaum Anwendung findet. Trotzdem lassen sich viele Vorhersagen dieses Modells empirisch belegen, z. B. dass der Aktivitätsbeginn bei kleinem τ präziser ist als bei großem τ . Das Umgekehrte gilt theoretisch wie empirisch für das Aktivitätsende.

Sehr viel bekannter und gebräuchlicher ist das Modell des nicht-parametrischen *entrainments*, denn es liefert das experimentelle Werkzeug, um die Physiologie des circadianen Systems zu überprüfen. Mit kurzen Lichtpulsen unter ansonsten konstanten Bedingungen kann man beispielsweise gezielt Phasenverschiebungen $\Delta\phi$ induzieren. Größe und Richtung von $\Delta\phi$ sind abhängig von der Phase ϕ , in der das circadiane System dem Lichtpuls ausgesetzt wird, und sind daher Funktionen von ϕ . Die graphische Darstellung dieser gemessenen Phasenverschiebung gegen ϕ resultiert in einer so genannten Phasen-Antwort-Kurve (engl.: *phase response curve*, kurz: PRC), die erlaubt, die Reaktion des circadianen Schrittmachers auf einen Lichtpuls vorherzusagen. ϕ erhält dabei die Dimension circadiane Zeit (CT). Ein kompletter Zyklus unter konstanten Bedingungen, bestehend aus subjektiver Nacht (Aktivitätsphase bei nachtaktiven Tieren) und subjektivem Tag (Ruhephase bei nachtaktiven Tieren), wird in 24 circadiane Stunden (24 h CT) eingeteilt, deren Länge $\tau/24$ ist. Der Aktivitätsbeginn bei nachtaktiven Tieren entspricht *per definitionem* CT 12.

Die Empfindlichkeit des endogenen Schrittmachers auf Lichtpulse oder phasische Lichtreize variiert systematisch. Empirische Daten vieler Spezies zeigten, dass Lichtpulse in der frühen subjektiven Nacht (CT 12 – CT 18) zu einer Phasenverzögerung und Lichtpulse in der späten subjektiven Nacht (CT 18 – CT 24) zu einem Phasenvorschub des circadianen Systems führen. Während des übrigen Tages (CT 0 – CT 12) hat Licht keinen nennenswerten Einfluss auf das circadiane System. Die Form der PRC für Licht ist bei allen Spezies bemerkenswert ähnlich, unabhängig davon, ob es sich um tag- oder nachtaktive Tiere handelt (Daan, 2000). Eine stabile Synchronisation des circadianen Rhythmus wird erreicht, wenn derselbe kurze Lichtpuls periodisch alle 24 h verabreicht und so die Phase der endogenen Oszillation auf

Tagesbasis angepasst wird. Wenn die Dauer des Lichtpulses so weit ausgeweitet wird, dass sie in einen 24 h LD-Zyklus mündet, bleibt der subjektive Tag in Phase mit der Lichtperiode und die subjektive Nacht in Phase mit der Dunkelheit. Jeweils zu Beginn und Ende der subjektiven Nacht wird die Differenz zwischen τ und T exakt ausgeglichen (Abb. 3). Das resultiert wiederum in einer stabilen Phasenwinkeldifferenz ψ (psi) zwischen dem intrinsischen Oszillator und dem Licht-Dunkel-Zyklus. Nach dem Modell ist ψ nicht nur vom Unterschied zwischen τ und T und der Form der PRC abhängig, sondern auch von der Lichtintensität des LD Zyklus (Pittendrigh und Daan, 1976), was allerdings bedeutet, dass in diesem phasischen Modell auch tonische Effekte einen Einfluss haben.

Die Phasenbeziehung zwischen dem Zeitgeber und der endogenen Rhythmik hängt aber ganz entscheidend neben der Form der PRC auch von τ ab. Da τ eine Funktion der Lichtintensität ist, wurde versucht, mit Hilfe der PRC Vorhersagen über τ zu treffen, was einerseits in einer Geschwindigkeits-Antwort-Kurve (engl.: *velocity response curve*, kurz τ RC) resultierte (Daan und Pittendrigh, 1976b) und andererseits eine Verbindung zwischen beiden Konzepten herstellte, denn so wurde eine phasische Komponente zum parametrischen Modell hinzugefügt.

Letztendlich ist ein experimenteller Ansatz, der phasische und tonische Effekte und damit beide Konzepte sauber voneinander trennen kann, schon theoretisch nicht denkbar. Jeder kurze Lichtpuls enthält auch tonische Information und die Wirkung von Änderungen in der Lichtintensität ist immer von der circadianen Phase des Organismus abhängig. Selbst die jeweiligen mathematischen Modelle enthalten sowohl parametrische als auch nicht-parametrische Komponenten (Daan, 2000). Schon Aschoff (1963) vermutete, dass die Synchronisation bei einem Großteil von Organismen durch eine Kombination aus beiden Ansätzen erreicht wird. Modellrechnungen mit einer Kombination von PRC und τ RC ergaben tatsächlich die beste Präzision des Schrittmachers, wenn dieser auf Licht mit gleichzeitigen Phasenverschiebungen und Geschwindigkeitsveränderungen reagiert (Beersma et al., 1999). Eine Phasenverzögerung muss mit Abbremsen und ein Phasenvorschub mit Beschleunigung einhergehen, um zu einer stabilen Synchronisation auf den Zeitgeber zu führen.

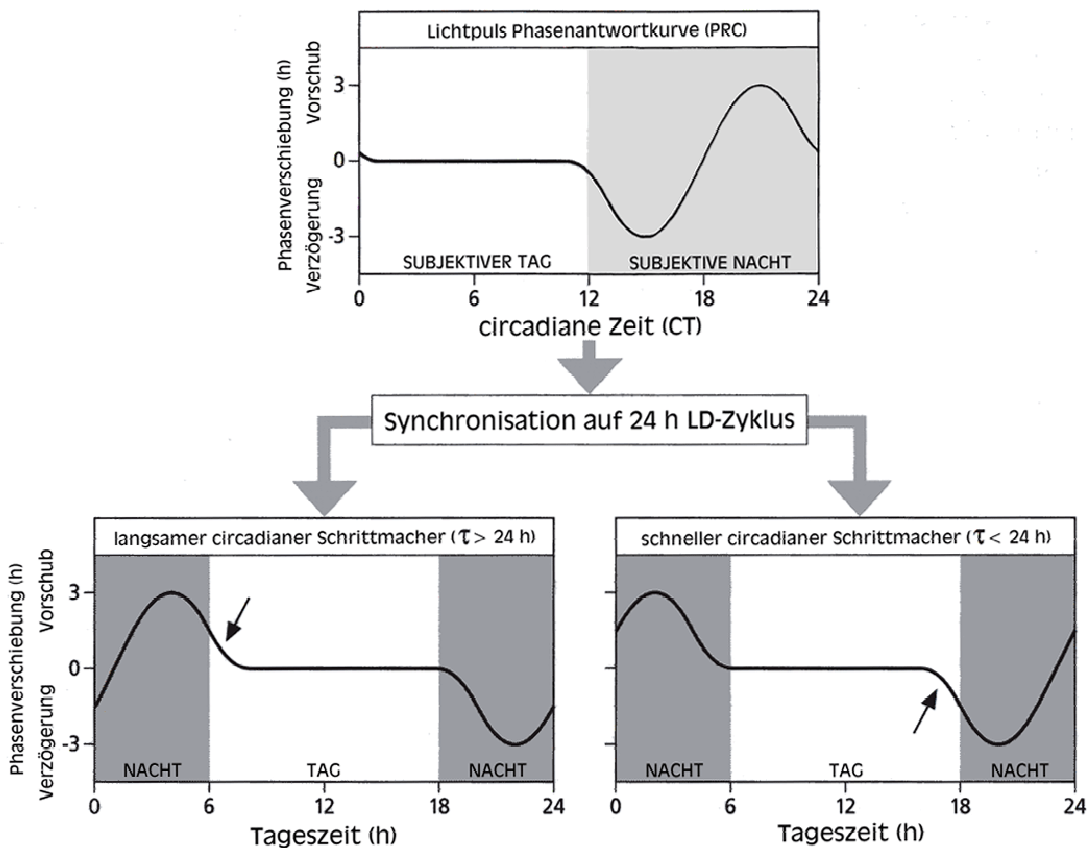


Abb. 3: Darstellung des Prinzips der Synchronisation nach dem nicht-parametrischen *entrainment* Modell. Die obere Graphik zeigt die typische Reaktion auf kurze, einzelne Lichtpulse unter konstantem schwachen Licht in einer Phasen-Antwort-Kurve (PRC). Ein Lichtpuls in der frühen subjektiven Nacht führt zu einer Phasenverzögerung, während ein Lichtpuls in der späten subjektiven Nacht einen Phasenvorschub des freilaufenden circadianen Rhythmus zur Folge hat. Unter einem 24 h LD-Zyklus (T) können solche Phasenverschiebungen die Abweichung der endogenen Periodenlänge τ von T korrigieren. Bei $\tau > 24$ h (Graphik unten links) verschiebt sich das Ende der subjektiven Nacht in den Tag, so dass die Vorschub-Zone der PRC in dem Ausmaß belichtet wird, welches zur Korrektur nötig ist. Bei $\tau < 24$ h (Graphik unten rechts) wird dementsprechend die Verzögerungs-Zone belichtet und der endogene Rhythmus durch eine Verzögerung korrigiert (Abb. aus (Hut, 2001), übersetzt)

2.3.3 Molekulare Grundlagen des circadianen Systems

2.3.3.1 Lichtsensitivität des circadianen Systems

So genannte *immediate early genes* (IEGs) stellen das Bindeglied zwischen externen Reizen und den darauf folgenden Veränderungen in der Zellfunktion dar, was ein allgemeines Phänomen neuronaler Systeme ist. Im SCN führt eine photische Stimulation der Retina unter anderem zur Expression des IEGs *c-fos* (Takahashi, 1993) und anschließend zum c-Fos Protein. Dieses wirkt als Transkriptionsfaktor und kontrolliert die Expression bestimmter Gene. Bemerkenswert an dieser Photoinduktion ist,

1. dass sie auf den retinorezipienten also ventrolateralen Teil des SCN beschränkt ist,
2. dass sie durch die circadiane Uhr auf die Zeiten beschränkt ist, zu denen Licht eine Phasenverschiebung im Aktivitätsrhythmus induzieren kann (Kornhauser et al., 1990; Kornhauser et al., 1996; Pévet et al., 1996), womit der SCN einen Tagesrhythmus in seiner Sensitivität auf Licht zeigt,
3. dass die Schwelle für eine *c-fos* Photoinduktion quantitativ mit dem phasenverschiebenden Effekt von Licht korrelierbar ist (Takahashi, 1993).

Allein diese Befunde weisen schon darauf hin, dass die *c-fos* Induktion stark mit dem photischen *entrainment* korreliert ist. Inzwischen konnte experimentell belegt werden, dass die aus den IEGs produzierten Proteine, z. B. c-Fos, an den *entrainment-pathways* beteiligt sind (Wollnik et al., 1995; Travnicková et al., 1996; Jelinková et al., 2000).

2.3.3.2 Erzeugung circadianer Rhythmen

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand werden circadiane Rhythmen auf molekularer Ebene in den Neuronen des SCN erzeugt. Eine Reihe von so genannten Uhrengenen bilden über einen negativen Transkription-Translation-basierten Rückkopplungsmechanismus die Rahmenelemente der circadianen Oszillation (Review in (King und Takahashi, 2000; Panda et al., 2002)). Der Ablauf dieser molekularen Oszillation sei hier nur grob umrissen (Abb. 4): Im Zellkern wird die Transkription der so genannten *Per* und *Cry*-Gene induziert, indem das Protein-Dimer CLOCK/BMAL1 an die Promoterregion dieser Gene bindet. Transkription und Translation führen dann zur Anreicherung der entsprechenden PER und CRY-Proteine im Zytoplasma. Durch die Dimerisierung mit CRY wird das PER-Protein stabilisiert, als

Monomer wird es dagegen durch eine Casein-Kinase (*doubletime*) phosphoryliert und anschließend abgebaut. Dadurch verzögert sich eine Anreicherung der PER/CRY-Dimere, die in den Zellkern eindringen können, und damit der weitere Ablauf des molekularen Uhrenmechanismus. So erreichen die PER/CRY-Dimere erst etwa 12 h nach Beginn der Transkription den Zellkern, wo CRY das CLOCK/BMAL1-Dimer an der Promoterregion hemmt und somit die *Cry* und *Per*-Transkription unterdrückt (Kume et al., 1999). Licht hat einen synchronisierenden Einfluss auf den molekularen Uhrenmechanismus, indem es die Produktion der *Per*-RNA stimuliert. Dadurch führt Licht am Nachtende letztendlich zu einem früheren Anstieg von PER und Licht am Nachtbeginn zu einem späteren Abfall der PER-Konzentration im Zytoplasma (Wager-Smith und Kay, 2000).

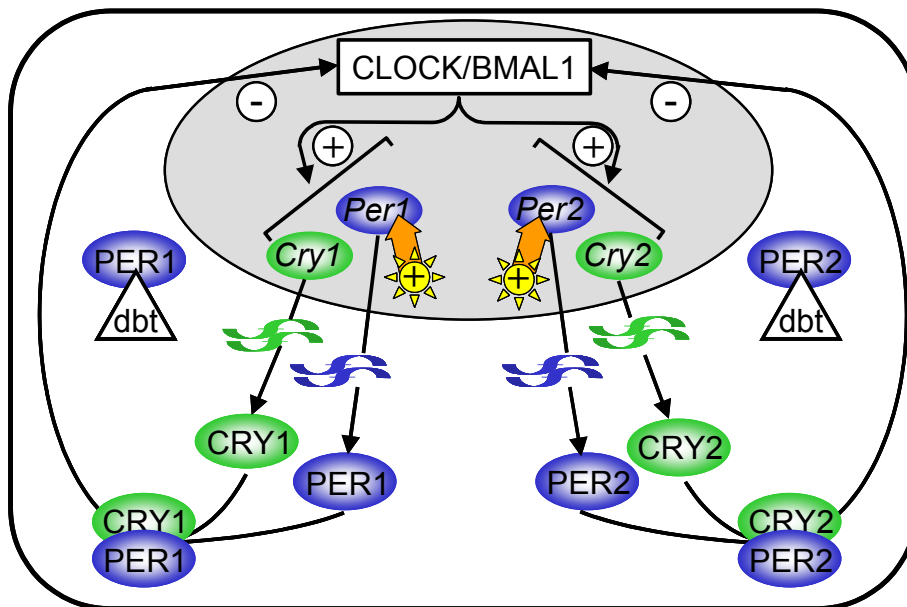


Abb. 4: Wesentliche Grundzüge der Erzeugung von circadianen Rhythmen auf molekularbiologischer Ebene bei Säugetieren: Die Transkription der Uhrengene *Per* und *Cry* im Zellkern (grau) wird durch das CLOCK/BMAL1-Dimer induziert. Licht stimuliert die Transkription der *Per*-RNA (~) von den *Per*-Genen und damit indirekt die Translation von PER-Proteinen. PER wird durch *doubletime* (*dbt*) phosphoryliert und anschließend abgebaut. Das stabile PER/CRY Dimer kann in den Kern eindringen, wo CRY CLOCK/BMAL1 hemmt.

2.3.4 Die Theorie der 2 gekoppelten Oszillatoren

Das Aktivitätsmuster vieler Säugetier-Spezies zeigt oft zwei gesonderte Aktivitätsmaxima innerhalb der Aktivitätsphase (α). In Dauerlicht-Bedingungen tritt häufig sogar ein „*splitting*“ der Aktivitätsphase in zwei Komponenten auf, die in ca. 180° Antiphase stabil miteinander koppeln. Das führte zu der Annahme, dass der circadiane Schrittmacher aus einem System von zwei gekoppelten Oszillatoren besteht (Pittendrigh und Daan, 1976b). Der eine ist unter einem LD-Regime an den Sonnenuntergang gebunden (*evening oscillator* (E)), der andere an den Sonnenaufgang (*morning oscillator* (M)). Weitere Hinweise zur Existenz zweier Oszillatoren lieferten elektrophysiologische Arbeiten an nachtaktiven Goldhamstern. In dorso-ventralen SCN-Schnitten beobachtet man zwar nur einen Peak in der elektrischen Aktivität während der Tagphase, aber in rostro-caudalen Schnitten sind morgens und abends zwei getrennte Peaks zu beobachten (Jagota et al., 2000). Der Anstieg des Morgen- und der Abfall des Abend-Peaks korrespondierten mit dem Anstieg und Abfall der elektrischen Aktivität im dorso-ventralen Schnitt.

Auch in den molekularen Mechanismen der circadianen Rhythmen finden sich Hinweise für die Theorie der gekoppelten Oszillatoren. Am Uhrenmechanismus sind jeweils zwei *Crys* und zwei *Pers* beteiligt. Der Grund dafür ist allerdings unklar, denn beide Protein-Dimere sind für sich in der Lage, eine circadiane Rhythmik aufrecht zu erhalten (Daan et al., 2001), wenn auch mit unterschiedlichen Eigenschaften: Daan et al. (2001) nehmen an, dass das *Per1/Cry1*-Paar durch Licht beschleunigt und durch Dunkelheit verlangsamt wird, damit an den Sonnenaufgang koppelt und den M-Oszillator darstellt. Dagegen wird das *Per2/Cry2*-Paar durch Licht gebremst und durch Dunkelheit beschleunigt, koppelt so an den Sonnenuntergang und stellt den E-Oszillator dar (Abb. 5).

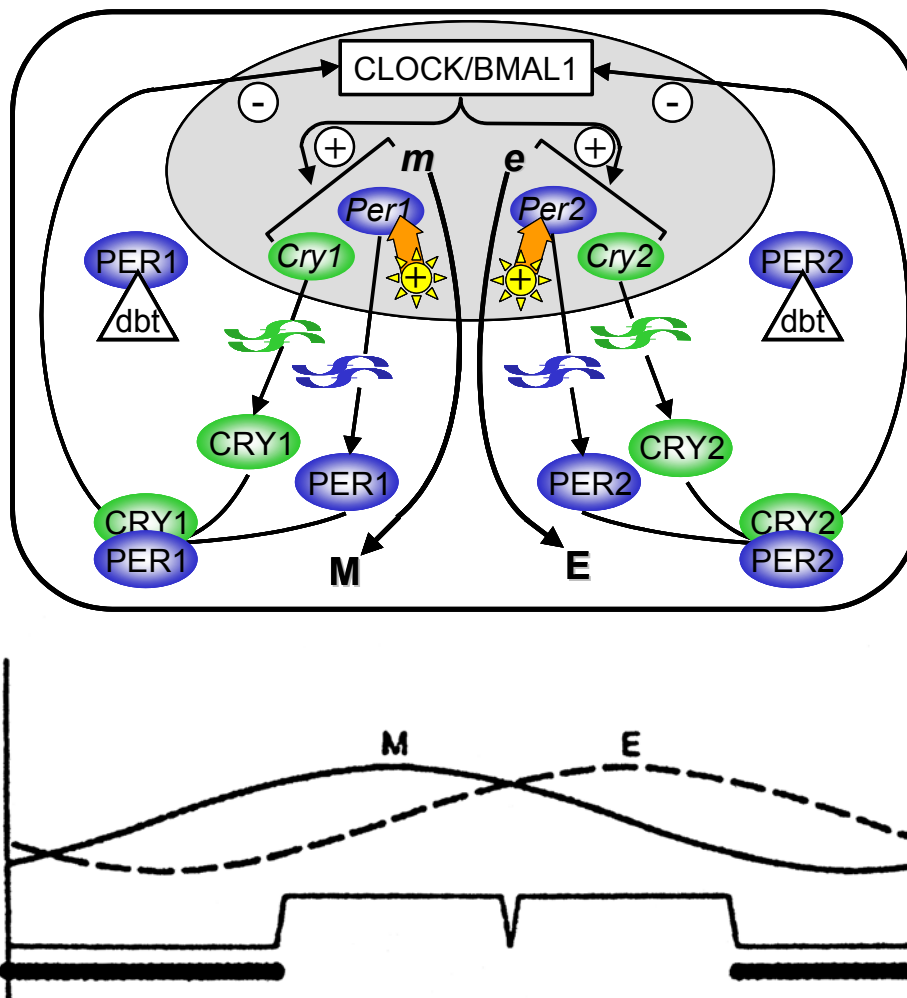


Abb. 5: Die Theorie der 2 gekoppelten Oszillatoren auf molekularer Ebene. Aufgrund der zeitlichen Differenz des Expressionsmaximum von *Per1/Cry1* und *Per2/Cry2* wird angenommen, dass das *Per1/Cry1*-Paar den M- (m-Gene) und das *Per2/Cry2*-Paar den E-Oszillator (e-Gene) darstellt (Daan et al., 2001), was letztendlich zu zwei Peaks in der elektrischen Aktivität des SCN (B, untere Kurve) und dem Aktivitätsmuster (schwarzer Balken) führt. M = M-Oszillator, E = E-Oszillator

Im ursprünglichen Modell der gekoppelten Oszillatoren wird die Forderung gestellt, dass $\tau_E < \tau_M$ (Pittendrigh und Daan, 1976b). Für die vorgeschlagene Paarung der Gene spricht unter anderem, dass gezeigt werden konnte, dass Mutanten, denen eine der M-Komponenten fehlte (*Per1* oder *Cry1*), eine kürzere Periodenlänge unter Dauerdunkel aufwiesen als der Wildtyp, während Mäuse mit einem *Cry2*-Defizit eine längere Periodenlänge hatten (Hotz Vitaterna et al., 1999; Zheng, B.H. et al., 2001). Die Vorhersagen, die in der auf molekulare Mechanismen erweiterten Version der Theorie der zwei gekoppelten Oszillatoren getroffen wurden (Daan et al., 2001), konnten inzwischen empirisch belegt werden (Steinlechner et al., 2002): Die Periodenlänge von *Per1*-mutierten Mäusen, deren Rhythmik lediglich auf den

E-Oszillator zurückzuführen ist, weil eine M-Komponente fehlt, war unter Dauerlicht verlängert, denn der E-Oszillator wird nach dem Modell durch Licht gebremst. Umgekehrt zeigten Mäuse mit einer *Per2*-Mutation unter Dauerlicht ein kürzeres τ , denn sie haben nur noch einen intakten M-Oszillator, der nach dem Modell durch Licht beschleunigt wird. Beide Effekte vergrößerten sich – wie von Daan et al. (2001) vorhergesagt – bei steigender Lichtintensität (Steinlechner et al., 2002). Eine gegenseitige Kopplung stabilisiert die Phasenbeziehung der beiden Oszillatoren zueinander, wobei es Hinweise gibt, dass der E-Oszillator über den M-Oszillator dominiert (Daan et al., 2001). So zeigten *Per2*-defiziente Mäuse einen weniger stabilen endogenen Rhythmus als *Per1*-defiziente Mäuse (Zheng, B. et al., 1999).

2.3.5 Melatonin als circadianes Signal

Die rhythmische Sekretion des Hormons Melatonin im Pinealorgan wird vom SCN kontrolliert (Abb. 6). Die vom RHT vermittelte photische Information wird vom SCN integriert. Von dort aus ziehen Efferenzen via PVN und medialem Vorderhirnbündel zu der *Columna intermediolateralis* im Rückenmark und weiter über sympathische Nervenfasern zum Ganglion *cervicalis superior*. Die postganglionären Neurone folgen Blutgefäßen (*Arteria carotis interna*) und stellen schließlich über die *Nervi conarii* eine adrenerge Verbindung zum Pinealorgan her (Klein, 1993; Ahrendt, 1995a; Moore, 1996). Die circadiane Rhythmik in der pinealen Melatoninsynthese wird bei Säugetieren ausschließlich vom SCN gesteuert (Moore, 1996). Unterbricht man die Kette zwischen SCN und Pinealorgan, wird kein Melatonin mehr gebildet. Zusätzlich wird das Pinealorgan über zahlreiche peptiderge Fasern innerviert, die das Melatoninsignal ebenfalls modulieren können (Ahrendt, 1995a).

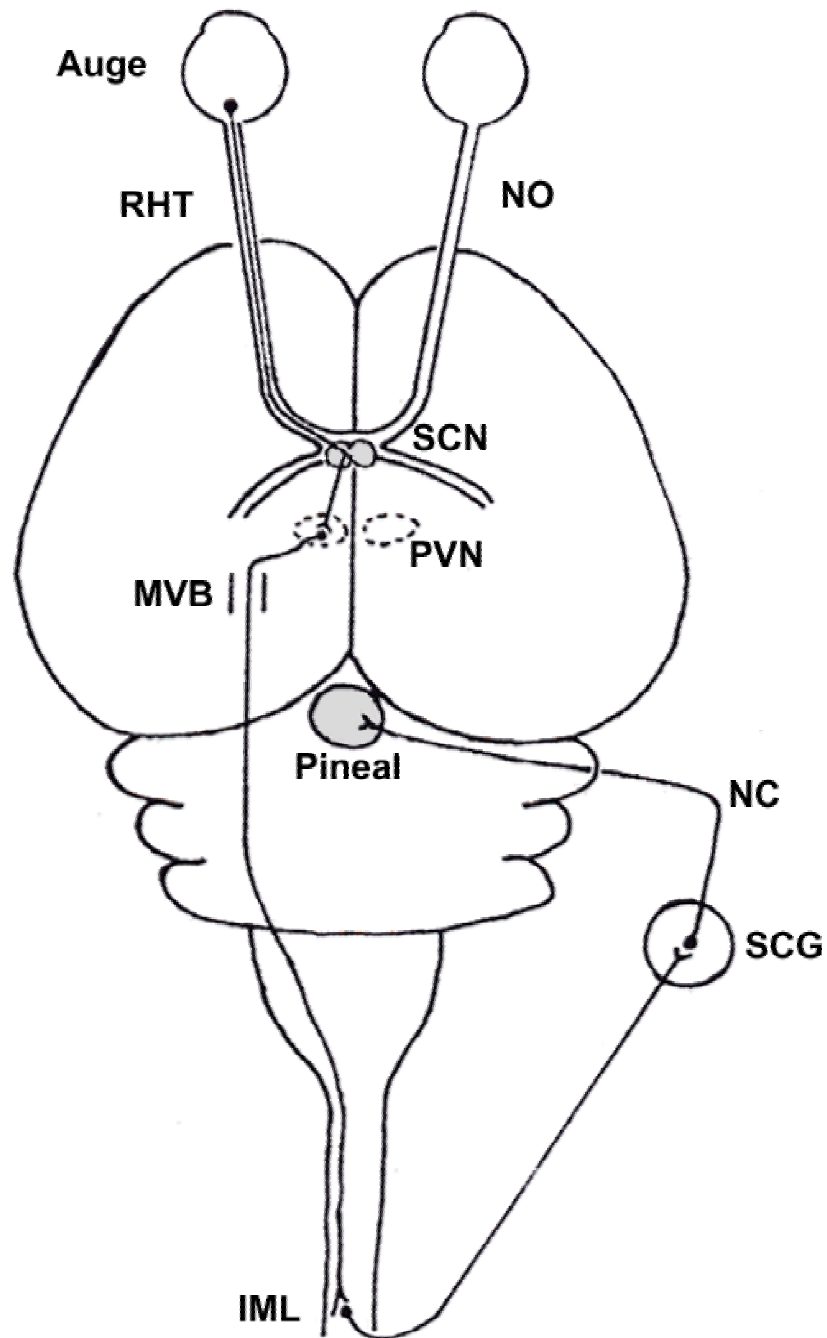


Abb. 6: Schematische Darstellung der Vermittlung der photischen Information über den Suprachiasmatischen Nucleus (SCN) zum Pinealorgan. IML = Columna intermediolateralis, MVB = mediales Vorderhirnbündel, NC = Nervi conarii, NO = Nervus opticus, RHT = retinohypothalamischer Trakt, SCG = Ganglion cervicale superior (Abb. aus (Moore, 1996) modifiziert)

2.3.5.1 Melatoninsynthese und -metabolismus

Der SCN zeigt tagsüber eine hohe neuronale Aktivität, nachts dagegen eine sehr geringe. Die Melatoninproduktion zeigt allerdings einen umgekehrten Rhythmus mit hohen Nachtwerten. Der SCN übt einen hemmenden Einfluss auf den PVN aus, so dass dessen Aktivität und die der übrigen nachgeschalteten Strukturen einen reziproken Rhythmus zeigen (Moore, 1996). Die Endigungen der sympathischen Afferenzen des Pinealorgans setzen daher nur nachts Noradrenalin frei, welches die Melatoninproduktion stimuliert. β -adrenerge Rezeptoren, die durch G-Proteine an *second-messenger*-Systeme gekoppelt sind, aktivieren ein transmembranes Signaltransduktionssystem und induzieren damit die Melatoninbiosynthese (Ahrendt, 1995b; Simonneaux und Ribelayga, 2003). Dabei kommt es zum Anstieg von cAMP und weiteren intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen, die zur gesteigerten Transkription von N-Acetyltransferase (NAT) führen (Abb. 7). Da dies das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Melatoninsynthese ist, steht die komplette biochemische Reaktion unter direkter Kontrolle des circadianen Schrittmachers. Andere Eingangssignale, wie α -adrenerge Agonisten, Peptide, Hormone und Kalzium, potenzieren das Signal des β -adrenergen Eingangs (Craft, 1993). Ausgangsstoff für die Melatoninproduktion ist Tryptophan, eine essentielle aromatische Aminosäure, die aktiv über einen Transportmechanismus in die Pinealozyten aufgenommen wird. Die Kaskade enzymatischer Reaktionen, die nach der Induktion durch Noradrenalin zur Synthese von Melatonin führt, sei hier nur grob beschrieben: Tryptophan wird durch Tryptophan-Hydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan (5HTP) umgesetzt und anschließend durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5HT) decarboxyliert. Dies wird durch die SCN-kontrollierte NAT zu N-Acetylserotonin acetyliert, welches durch die Hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) zu Melatonin umgesetzt wird (Craft, 1993; Ahrendt, 1995b). Die Aktivität von HIOMT wird nicht ausschließlich über eine Stimulation durch Noradrenalin reguliert, sondern wird zusätzlich über verschiedene Neuropeptide, z. B. NPY (Neuropeptid Y) moduliert (Ribelayga et al., 1998; Simonneaux und Ribelayga, 2003). Melatonin wird schließlich in das Blut abgegeben und kann dank seiner Lipophilie in jedes Gewebe eindringen und allen Strukturen, die diese humorale Botschaft entschlüsseln können, also Melatoninrezeptoren haben, eine Information über die Tageszeit vermitteln.

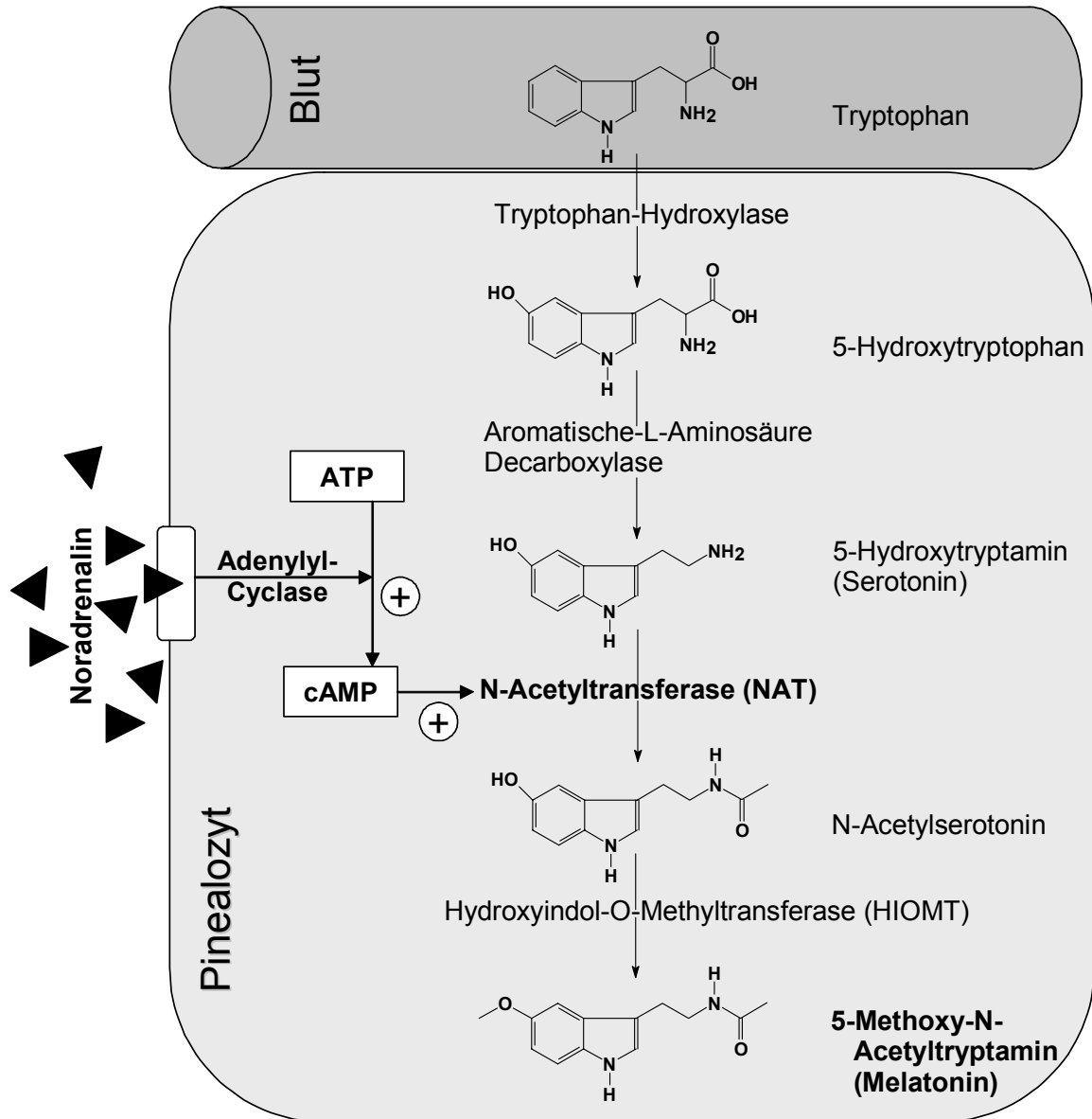


Abb. 7: Verlauf der Melatoninsynthese

Die Tatsache, dass das Pinealorgan die zweithöchste Durchblutung nach der Niere aufweist, zeigt die Wichtigkeit des circadianen Melatoninsignals für den Körper (Ahrendt, 1995a). Als eine vom circadianen Schrittmacher kontrollierte Körperfunktion zeigt der Melatoninrhythmus ähnlich dem Aktivitätsrhythmus unter konstanten Bedingungen einen Freilauf. Allerdings nur im Dauerdunkel und nicht im Dauerlicht, denn Licht unterdrückt die Melatoninproduktion. Ein einminütiger Lichtpuls reicht aus, um als Folge der fehlenden noradrenergen Stimulation von NAT die Melatoninsynthese zu unterdrücken und die Melatoninwerte im Plasma auf Tagesniveau abzusenken (Ahrendt, 1995c). Die Lichtstärke, die dazu gebraucht wird, variiert allerdings von Spezies zu Spezies (Reiter, 1986). Damit ist

die Melatoninbiosynthese nicht nur ausschließlich auf die Dunkelfase beschränkt und somit ein humorales Signal für die Nacht, sondern auch durch kurze Lichtpulse im 24 h Takt synchronisierbar (Ahrendt, 1995c).

Melatonin wird hauptsächlich in der Leber, aber auch zu einem geringeren Anteil in den Nieren katabolisiert. Dabei wird Melatonin zunächst an Position 6 hydroxyliert und anschließend größtenteils zu 6-Sulfatoxymelatonin (aMT6s) sulfatisiert und damit wasserlöslich (Abb. 8). Ein bei Nagetieren wesentlich kleinerer Anteil wird zu 6-Hydroxymelatonin umgewandelt (Kopin, 1961; Ahrendt, 1995b). Die Wasserlöslichkeit erlaubt es, dass aMT6s über den Urin ausgeschieden werden kann. Der Melatoninkatabolismus in der Leber zeigt keine diurnalen Schwankungen (Nowak et al., 1987), so dass inzwischen für den Menschen (Ahrendt, 1995b), den Dsungarischen Zwerghamster (Stieglitz et al., 1995) und die Ratte (Brown et al., 1991; Klante et al., 1999) gezeigt werden konnte, dass die aMT6s-Profile von Plasma und Urin zuverlässig die Eigenschaften der täglichen Melatonsynthese widerspiegeln, und zwar sowohl qualitativ als auch quantitativ. Aufgrund des Katabolismus ist der Rhythmus allerdings 1 - 2 h zeitverzögert. Daraus ergibt sich eine zuverlässige, nicht-invasive Methode um die circadiane Melatoninsekretion zu verfolgen, die auch in einem Teil dieser Arbeit angewandt wurde.

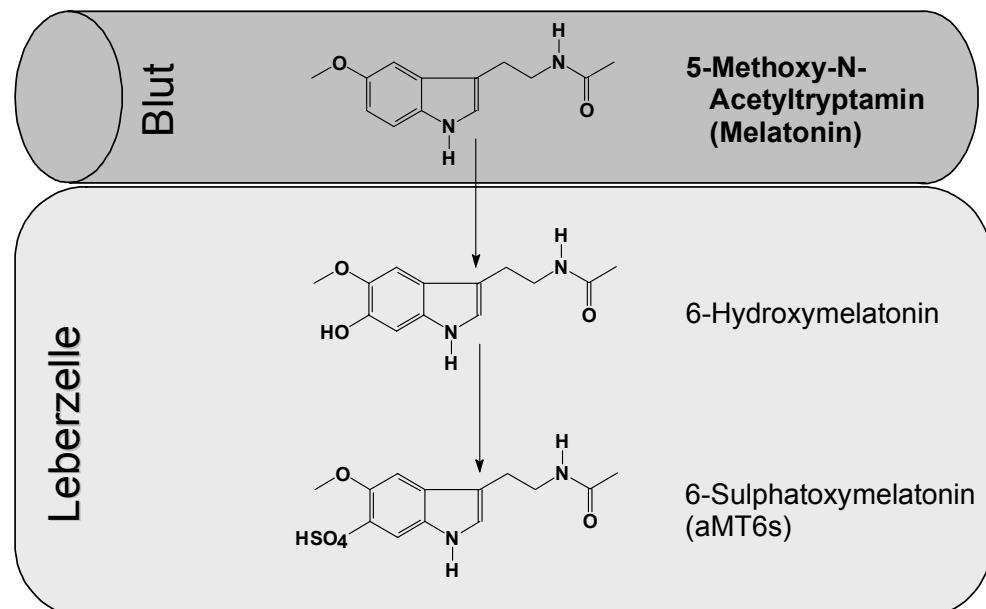


Abb. 8: Metabolismus des Melatonins zu Sulfatoxymelatonin (aMT6s)

2.3.5.2 Die Bedeutung des Melatonins für circadiane Rhythmen

Bei Vertebraten sind inzwischen 4 Rezeptor-Subtypen (MT1, MT2, MT3 und Mel_{1c}) in mehr als 110 Gehirnstrukturen identifiziert (Pévet, 2003), allerdings gibt es zwischen den Spezies große Unterschiede in der Anzahl und genauen Lokalisation (Masson-Pévet et al., 1994a). Außerdem gibt es zahlreiche Melatoninbindungsstellen in peripheren Geweben, deren Rolle nicht weiter bekannt ist. Dennoch zeigt ihre Existenz, dass die Melatoninbotschaft auf verschiedenen Ebenen des Organismus gelesen werden kann (Pévet, 2003). Bei Säugetieren konnten Melatoninrezeptoren im SCN nachgewiesen werden (Armstrong und Redman, 1993; Pévet, 2003), so dass ein Rückkopplungsmechanismus zwischen dem Pinealorgan und dem SCN möglich ist.

Es ist bekannt, dass Melatonin die metabolische und elektrische Aktivität des SCN und die Fähigkeit zur Resynchronisation, d. h. die erneute Synchronisation des endogenen Rhythmus auf einen phasenverschobenen Zeitgeberzyklus, beeinflusst (Pévet, 2003). Weiterhin wird die Phasenbeziehung verschiedener innerer Rhythmen unter LD durch Pinealektomie beeinflusst. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das pineale Melatonin einer internen Desynchronisation vorbeugt (Armstrong und Redman, 1993). Außerdem hat die Verabreichung von pharmakologischen Dosen Melatonin eindeutig chronobiotische Wirkung, d. h. Einfluss auf Phase oder Periode der circadianen Uhr. Tägliche Melatoningaben führen zur Synchronisation von freilaufenden Aktivitätsrhythmen bei Nagetieren (Redman et al., 1983; Kirsch et al., 1993; Schuhler et al., 2002), allerdings nicht, wenn die Tiere SCN-läsioniert sind (Cassone et al., 1986a), was für den SCN als Wirkungsort spricht. Als Wirkungsort des Melatonins für die Synchronisation von Aktivitätsrhythmen kommt, wegen seiner Melatoninrezeptoren und der neuronalen Verbindungen zu motorischen Zentren, außerdem der PVT in Betracht (Pévet et al., 1996). Der synchronisierende Effekt von exogen verabreichtem Melatonin hängt vom vorhergehenden τ ab. Ist $\tau < 24$ h, kommt es zu einer Phasenverzögerung, bei $\tau > 24$ h zu einem Phasenvorschub (Kirsch et al., 1993; Schuhler et al., 2002). Außerdem induzieren Melatoningaben am späten Nachmittag sowohl unter kurzer als auch langer Photoperiode einen sofortigen Vorschub der lichtinduzierten c-Fos-Expression. Da c-Fos als Marker für die intrinsische Rhythmik des SCN gilt, kann exogen verabreichtem Melatonin eine direkte Wirkung auf die innere Uhr zugesprochen werden (Sumová und Illnerová, 1996).

Allerdings beschränkt sich das Reaktionsvermögen auf exogen verabreichtes Melatonin auf einen kurzen Zeitraum am frühen Nachmittag, was gegen eine Rolle von endogenem Melatonin im Synchronisationsprozess spricht. Offensichtlich hat das Melatonin bei Säugetieren, anders als bei Nichtvertebraten, nur eine sehr begrenzte Rolle in der Generierung und Aufrechterhaltung circadianer Organisation des Organismus. Dafür sprechen eine Vielzahl von Befunden, die zeigen, dass sich freilaufende circadiane Rhythmen durch eine Pinealektomie kaum verändern (Pévet, 2003). Letztendlich ist die Rolle von endogenem Melatonin noch nicht befriedigend geklärt. Trotz der vielen Hinweise auf eine Rolle von endogenem Melatonin im Synchronisationsprozess konnten circadiane Reaktionen auf exogene Melatoningaben nur mit pharmakologischen Dosen erreicht werden (Cassone et al., 1986b), so dass noch ein zusätzlicher Mechanismus involviert sein muss (Pévet, 2003).

2.4 Saisonale Rhythmen und das circannuale System der Säugetiere

Als Anpassung an saisonale Schwankungen in der Nahrungsverfügbarkeit und im Klima ihrer Habitate haben viele Organismen sowohl Mechanismen zur saisonalen Zeitmessung als auch saisonale Rhythmen bei einer Vielzahl physiologischer und verhaltensbiologischer Parameter entwickelt. Daher sind viele biologische Aktivitäten und physiologische Prozesse auf Jahreszeiten konzentriert, in denen ein optimaler Effekt am wahrscheinlichsten ist, so dass die Lebensweise bestmöglich auf die schwierigen Umweltbedingungen angepasst ist (Gwinner, 1986). Die Reproduktionszeit wird so auf das Jahr abgestimmt, dass die Geburt des Nachwuchses in die Zeit der besten Nahrungsverfügbarkeit fällt und so die Wahrscheinlichkeit des Überlebens sowohl für Eltern als auch für den Nachwuchs erhöht ist (Zucker, 2001). Gewöhnlich ist dies die Frühjahrs- oder Sommerzeit, wenn zusätzlich die Temperaturen nahe der Thermoneutralzone liegen. Durch eine große Variation zwischen den Spezies in der Graviditätsdauer variieren auch die jeweiligen Reproduktionsphasen (Hastings et al., 1985). Der primäre Umweltparameter, der die Gonadenaktivität stimuliert, ist die Photoperiode. Bei Nagetieren mit einer kurzen Tragzeit wirken die langen Photoperioden des Frühjahrs und Sommers induzierend auf das Reproduktionssystem, während es bei Schafen mit einer mehrmonatigen Tragzeit die kurzen Herbst- und Wintertage sind (Turek und Van Cauter, 1994). Daher werden so genannte *longday breeder* (aus dem Engl. für „Langtagtiere“) von *shortday breeder* (aus dem Engl. für „Kurztagtiere“) unterschieden. Alle Prozesse, die die Reproduktion unterstützen, aber nicht unmittelbar daran beteiligt sind, wie Revierbesetzung und -verteidigung, sind an den Reproduktionszyklus gekoppelt (Zucker, 2001). Ein weiteres überlebenswichtiges Ereignis im Jahresverlauf ist die Überdauerung der schlechten Jahreszeit mit ihren ungünstigen Bedingungen, z. B. Nahrungsknappheit und Kälte. Als Überdauerungsstrategien dienen in unseren Breiten verschiedene Lethargiezustände, wie beispielsweise der Winterschlaf oder das saisonal begrenzte Abwandern von Zugvögeln in Gebiete mit günstigeren Konditionen (Gwinner, 1986). In jedem Fall ist eine komplette Umstellung der Physiologie erforderlich, deren präzises Timing lebensnotwendig ist, damit dieser Prozess und andere Vorbereitungen schon vor Wintereinbruch vollzogen sind. Die Bandbreite an physiologischen und verhaltensbiologischen Parametern, die parallel zu den

Reproduktions- und Ruhephasen im Jahresverlauf oszillieren, umspannt beispielsweise saisonale Wechsel im Futter- und Wasserverbrauch, der Fell- oder Federqualitäten, Thermoregulation, Schlaf, Körper- und Gehirnmasse, Sekretion von Hormonen und Neurotransmitter-Konzentrationen im Gehirn sowie aggressive und zugängliche Verhaltensweisen (Zucker, 2001).

Circadiane Parameter variieren ebenfalls saisonal. Beim Europäischen Feldhamster zeigte sich ein rhythmisches Aktivitätsmuster mit hoher Aktivität nur um die Sommersonnenwende (Wollnik et al., 1991). Während des übrigen Jahres war die Rhythmik schwächer. Beim Ziesel verändert sich der Phasenwinkel ψ und τ des Aktivitätsmusters im Jahresverlauf (Mrosovsky et al., 1976; Lee et al., 1986; Lee und Zucker, 1995). Biber (*Castor canadensis*), die normalerweise gut auf den Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert sind, zeigen sogar unter natürlichen Bedingungen während der Wintermonate einen Freilauf in ihrer Aktivität mit $\tau = 27$ h (Bovet und Oertli, 1974) und Feldmäuse (*Microtus arvalis*) wechseln von überwiegender Nachtaktivität während des Sommers zu Tagaktivität im Winter (Hoogenboom et al., 1984). Ein anderer circadianer Parameter, der ebenfalls von den photoperiodischen Veränderungen der Umwelt beeinflusst wird, ist die Melatoninproduktion, deren Dauer proportional zur Nachtlänge ist (Steinlechner, 1992). Besonders stark ist diese Tendenz beim Europäischen Feldhamster zu beobachten, der während der kurzen Sommernächte gar kein Melatonin mehr produziert (Vivien-Roels et al., 1992; Vivien-Roels et al., 1997; Vivien-Roels et al., 1998). Die saisonalen Variationen in zwei circadianen Parametern reflektieren sehr wahrscheinlich einen direkten Einfluss der Photoperiode auf den SCN (Pévet et al., 1996).

2.4.1 Klassifikation saisonaler Rhythmen

Saisonale Rhythmen können in unterschiedlichem Maß endogen gesteuert sein. Man unterscheidet generell 3 Typen von saisonalen Rhythmen (Zucker, 2001): Typ-III-Rhythmen, wie die allergischen Reaktionen auf jahreszeitlich begrenzten Pollenflug, folgen ausschließlich passiv den Periodizitäten der Umwelt, so dass auf sie nicht weiter eingegangen wird. Die anderen beiden Typen sind dagegen mehr oder weniger stark endogen gesteuert. Typ-I-Rhythmen beinhalten zwar eine starke endogene Komponente, allerdings erlischt die endogene Oszillation in Abwesenheit von Umweltsignalen nach spätestens einem kompletten Zyklus. Diese Art von Rhythmik ist bei kurzlebigen Arten der gemäßigten Zonen weit

verbreitet, z. B. beim Goldhamster (Reiter, 1972; Turek und Campbell, 1979) und beim Dsungarischen Zwerghamster (Hoffmann, 1973; Goldman, 2000). Die echten circannualen Rhythmen bezeichnet man als Typ-II-Rhythmen. Sie sind komplett endogen gesteuert und bleiben für mindestens 2 vollständige Zyklen unter konstanten Bedingungen bestehen. Viele langlebige Arten verschiedener Klassen zeigen Typ-II-Rhythmen. Bei den Vertebraten sind es vor allem Zugvögel und Arten aus verschiedenen Ordnungen der Säugetiere, wie z. B. Nagetiere, Fleischfresser, Huftiere, Fledermäuse und Primaten (Gwinner, 1986). Auch viele winterschlafende Säugetierarten wie Murmeltiere (*Marmota* spp.) (Concannon et al., 1992) und Ziesel (*Citellus* spp./*Spermophilus* spp.) (Pengelley, 1974; Gwinner, 1986) zeigen circannuale Rhythmen. Die Fülle von Möglichkeiten, konstante photoperiodische Bedingungen herzustellen, erschwert allerdings den Nachweis von circannualen Rhythmen. Neben Dauerlicht und Dauerdunkel-Bedingungen, wie sie zum Nachweis von circadianen Rhythmen verwendet werden, ist im Prinzip jede beliebige Photoperiode zum Nachweis circannualler Rhythmen denkbar, sofern sie für mehrere Jahre konstant gehalten wird. Einige Spezies zeigen jedoch nur unter ganz bestimmten Bedingungen circannuale Rhythmen (Turek und Van Cauter, 1994). Möglicherweise sind daher noch nicht alle saisonalen Arten richtig eingestuft. Während Stare (*Sturnus vulgaris*) ausschließlich unter konstantem LD12:12 eine circannuale Rhythmik zeigten (Gwinner, 1986), waren beim Sika-Hirsch (*Cervus nippon*) circannuale Rhythmen im Geweihabwurf oder im Wachstum unter Dauerlicht, LD16:08 und LD08:16, aber nicht unter LD12:12 zu beobachten (Goss, 1984). Die Periodenlänge der circannualen Rhythmen liegt meist zwischen 10 - 12 Monaten (Gwinner, 1986). Allerdings gibt es eine große inter- und intraindividuelle Variabilität, so dass Periodenlängen zwischen 7 und 15 Monaten beobachtet wurden. Die circannuale Periodenlänge von Goldmantelzieseln (*Citellus lateralis* / *Spermophilus lateralis*) variierte sogar um 161 Tage in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen (Pengelley, 1974).

Der Vergleich von Typ-I- und Typ-II-Rhythmen bei Tieren, die unter Langtagbedingungen reproduktiv sind, ergibt viele Gemeinsamkeiten im Reproduktionszyklus: Abnehmende Tageslichtlänge führt zur Gonadenregression, natürlicherweise am Ende des Sommers, und die Dauer der anschließenden sexuellen Ruhephase wird durch einen spezies-spezifischen Intervall-Timer bzw. Sanduhr-Mechanismus festgelegt (Zucker, 2001). Dieser Mechanismus erlaubt es vielen Nagetieren, den Winter vollkommen isoliert von der Umwelt und damit ohne Zeitgeber in unterirdischen Höhlen mit Winterschlaf zu verbringen. Das Gonadenwachstum am Ende der Ruhephase kann in beiden Fällen durch zunehmende Tageslichtlänge angeregt

werden. In Abwesenheit eines stimulierenden photoperiodischen Signals, wie z. B. im Dauerdunkel des Winterbaus oder in künstlichen konstanten Kurztagbedingungen, werden die Gonaden aber auch endogen wieder ausgebildet.

Die Unterschiede zwischen Typ-I- und Typ-II-Rhythmen werden erst deutlich, wenn die Tiere weiterhin unter Kurztagbedingungen gehalten werden. Typ-II-Tiere folgen dann dem endogen gesteuerten Zyklus aus Gonadenregression und –wiederausbildung, während Typ-I-Tiere trotz inhibierender kurzer Photoperiode zeitlebens im reproduktiven Zustand bleiben (Reiter, 1972), d. h. sie sind nicht mehr in der Lage, dieses photoperiodische Signal wahrzunehmen. Um diesen photorefraktären Zustand zu durchbrechen und ein Fortfahren im Reproduktionszyklus zu ermöglichen, ist eine 11-wöchige Langtagexposition nötig (Stetson et al., 1977). Eine Gonadenregression ist demnach bei Typ-I-Tieren nur nach Kurztagexposition im nicht-refraktären Zustand möglich und damit obligatorisch an photoperiodische Signale gebunden. Zur Unterscheidung von Typ-II-Zyklen, die eine sich selbst erhaltende Oszillation darstellen und damit als circannual bezeichnet werden dürfen, werden Tiere, die den elementareren Typ-I-Rhythmus zeigen, als photoperiodische Spezies bezeichnet.

Ein typisches Beispiel für die starke Abhängigkeit der Typ-I-Rhythmen von der Photoperiode ist der Goldhamster, der - egal zu welchem Zeitpunkt im Jahreszyklus - bei einem Transfer in eine Photoperiode von mehr als 12,5 h Tageslicht grundsätzlich die Gonaden ausbildet (Gaston und Menaker, 1967). Ein Transfer in eine kürzere Photoperiode führt dagegen beim Goldhamster generell zur Gonadenregression, worauf nach etwa 25 Wochen eine spontane Wiederausbildung folgt (Elliott, 1981). Dagegen wird die photoperiodische Information bei echten circannualen Rhythmen lediglich zur Synchronisation auf das natürliche Jahr genutzt, d. h. diese Rhythmen können nur in sehr begrenztem Maße manipuliert werden. Bei circannualen Nutztieren, wie den Schafen, wird intensiv daran geforscht, diesen Mechanismus zu umgehen, um die Reproduktionsphase auch auf andere Jahreszeiten auszudehnen und so den Profit durch Fleisch und Milch zu steigern.

Feldhamster wurden von Gwinner (1986) nur bedingt zu den circannualen Spezies gezählt, weil in den bis dahin bekannten Arbeiten lediglich ein kompletter Zyklus beobachtet wurde, z. B. im Körpergewicht, Urinvolumen und der Aldosteronexkretion (Canguilhem und Bloch, 1966), in der renalen Natriumionenexkretion (Harberey et al., 1967) und im Noradrenalin-*turnover* im Gehirn (Kempf et al., 1978). Damit hebt sich der Feldhamster allerdings schon deutlich von den photoperiodischen Spezies ab, die lediglich einen Teil des Zyklus, nämlich den Übergang in den reproduktiven Status, endogen bewältigen können. Inzwischen wurden in mindestens zwei Arbeiten zwei und mehr komplette Oszillationen im Körpergewicht unter LD12:12 (Canguilhem, 1989) und im Reproduktionsstatus unter LD10:14 (Masson-Pévet et al., 1994b) beschrieben - allerdings nur bei einzelnen Tieren.

Warum sich zwei Arten von Saisonalität entwickelt haben, ist ungeklärt, ebenso die ökologischen Faktoren, die die Evolution von Typ-II-Rhythmen begünstigten, außer dass offensichtlich eine höhere Lebensdauer Voraussetzung ist (Zucker, 2001). Für weit migrierende Arten ist eine echte circannuale Organisation als Puffer gegen irreführende photische Signale sicher von Vorteil. Dagegen wären für winterschlafende Arten Typ-I-Rhythmen vollkommen ausreichend. Trotzdem bilden Ziesel Typ-II-Rhythmen aus. Bei den relativ ortsbundenen Huftieren, die kontinuierlichen Zugang zu einem verlässlichen Zeitgeber haben, ist ein Typ-II-Rhythmus ebenso unnötig.

2.4.2 Neuronale und humorale Grundlagen von Typ-II-Rhythmen

Im Gegensatz zum circadianen System ist relativ wenig über das circannuale System bekannt. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand (Zucker, 2001) wurden bisher weder neuronale noch endokrine Strukturen identifiziert, die für die Erzeugung circannualer Rhythmen essentiell wären: Läsionen zahlreicher Strukturen im zentralen Nervensystem führten in keinem Fall zu einer Eliminierung circannualer Rhythmen, allenfalls zu schwachen Modifikationen in einzelnen Parametern der Oszillation. Die folgenden getesteten Strukturen können als neuronales Substrat circannualer Rhythmen ausgeschlossen werden: Der laterale und anteriore Hypothalamus, der hypothalamische ventrolaterale Nukleus, der PVN, der olfaktorische Bulbus, das laterale Septum und der Nervus vagus. Auf endokriner Ebene gab es bisher ebenfalls nur negative Befunde (Zucker, 2001): Weder Gonadektomie noch Pinealektomie beeinträchtigen die Ausprägung normaler circannualer Rhythmen. Bei Schafen hatte eine Schilddrüsenektomie ähnlich wie die großflächige Zerstörung der vorderen hypothalamischen

Region zwar einen Einfluss auf den circannualen Reproduktionszyklus, indem sich die reproduktive Phase ausdehnt, andere circannuale Rhythmen blieben allerdings unbeeinflusst. Möglicherweise sind diese beiden Strukturen an der photischen Kontrolle des Reproduktionszyklus beteiligt.

Die Frage, ob circannuale Rhythmen angeboren sind, konnte bisher auch noch nicht geklärt werden (Zucker, 2001). Ziesel, die von Geburt an unter konstanter Photoperiode gehalten wurden, zeigten normale circannuale Rhythmen. Allerdings konnte in diesen Experimenten der Einfluss der Mutter nicht ausgeschaltet werden, die den Föten schon pränatal Informationen über die Photoperiode vermittelt (Stetson et al., 1989). Ein eindeutiger Beweis für das Angeborenssein circannualer Rhythmen ließe sich nur erbringen, wenn die Jahresuhr der Mutter ausgeschaltet ist, was ohne das Wissen über deren Lokalisation unmöglich ist.

Analog zur Oszillatortechnik wurde das Modell der Frequenz-Demultiplikation zur Erklärung circannualer Rhythmen entwickelt (Gwinner, 1986). Es geht davon aus, dass eine circannuale Oszillation durch Transformation circadianer Schwingungen in eine geringere Frequenz entsteht. Circannuale Rhythmen entstehen demnach durch Zählen von subjektiven, circadianen Zyklen, womit dem SCN eine bedeutende Rolle für die Generierung circannualer Rhythmen zugeschrieben wurde. Die Theorie wurde jedoch bald widerlegt: Nach dem Modell sollten die Periodenlängen beider Rhythmen proportional zueinander sein. In mehreren Spezies konnte jedoch nachgewiesen werden, dass in T-Zyklen mit $T \neq 24$ h die circannuale Periodenlänge unbeeinflusst blieb (Carmichael und Zucker, 1986; Gwinner, 1986). Umgekehrt ließen sich circannuale Rhythmen auch auf photoperiodische Zyklen synchronisieren, die stark von einem Jahr abweichen, obwohl die circadiane Oszillation dem täglichen Licht-Dunkel-Wechsel von 24 h folgte. Schließlich zeigten SCN-läsionierte Ziesel unter verschiedenen Lichtbedingungen zwar keinen circadianen Aktivitäts- und Körpertemperaturrhythmus mehr, aber vorwiegend ganz normale circannuale Körpergewichts- und Reproduktionsrhythmen (Zucker et al., 1983), und zwar unabhängig davon, in welcher Phase des circannualen Zyklus läsioniert wurde (Dark et al., 1985). Der SCN scheint damit nicht von essentieller Bedeutung für die Generierung circannualer Rhythmen zu sein.

Nichtsdestotrotz beeinflusst eine SCN-Läsion bei Zieseln nahezu jeden Aspekt des saisonal auftretenden Winterschlafs (Ruby et al., 1996). Verglichen mit Kontrolltieren war die Anzahl der Winterschlafschübe (Torpor) und die Gesamtdauer des Winterschlafes erhöht, während die Torpordauer geringer und viel variabler geworden war. Die Hälfte der Tiere zeigte sogar für etwa 2 Jahre kontinuierlichen Winterschlaf, d. h. die einzelnen Torporphasen waren in diesem Zeitraum nie mehr als 10 Tage voneinander getrennt. Auch beim Europäischen Feldhamster konnte ein Zusammenhang zwischen der zeitlichen Organisation des Winterschlafs und circadianen Rhythmen gezeigt werden (Wollnik und Schmidt, 1995; Waßmer und Wollnik, 1997). Damit ist der SCN Teil des Mechanismus, der die Winterschlafdauer und die temporäre Struktur der Winterschlafschübe kontrolliert, und somit an der Regulation einer saisonalen Körperfunktion beteiligt.

2.4.3 Synchronisation circannualer Zyklen

Der effektivste Zeitgeber für die Synchronisation circannualer Rhythmen auf das natürliche Jahr ist die Photoperiode (Gwinner, 1986; Goldman, 2001; Gorman et al., 2001). Sowohl sinusförmige Lichtregime, die den natürlichen Wandel der Photoperiode nachahmen, als auch sägezahnförmige, abrupte Lichtwechsel, die nur einmal pro Zyklus zwischen einer langen und einer kurzen Photoperiode wechseln, sind imstande, den endogenen Jahreszyklus zu synchronisieren. Mit künstlichen Photoperioden lassen sich die Jahresrhythmen auch auf Periodenlängen, die nicht 365 Tagen entsprechen, synchronisieren. Außerdem gleicht sich die Phasenlage des endogenen Rhythmus nach Phasenverschiebung des photoperiodischen Zyklus innerhalb weniger Zyklen an. In allen bisher untersuchten Spezies konnte gezeigt werden, dass die Photoperiode ein effektiver Zeitgeber ist (Zucker, 2001). Andere Zeitgeber, wie Temperaturzyklen oder soziale Stimuli, sind weit weniger wirksam. In Abhängigkeit von der photoperiodischen Vergangenheit kann die aktuelle Photoperiode allerdings sowohl als Langtag als auch als Kurztag interpretiert werden (Goldman, 2001).

2.4.3.1 Circannuale Phasen-Antwort-Kurven

Die Synchronisation circannualer Rhythmen erfolgt theoretisch genauso wie die circadianer Rhythmen: Durch einen Zeitgeber wird die Periode ($\Delta\tau$) des endogenen Rhythmus angepasst und/oder seine Phase ($\Delta\phi$) korrigiert (Daan, 1985). Aus praktischen Gründen fand in der circannualen Forschung bisher nur das nicht-parametrische *entrainment*-Modell Anwendung.

So wurde beispielsweise gezeigt, dass sowohl phasisch verabreichte photoperiodische als auch humorale Signale zu einer Phasenverschiebung des circannualen Rhythmus führen (Zucker, 2001). Bei Goldmantelzieseln hat der vorübergehende Transfer in kurze Photoperiode im Sommer (Hiebert et al. in Präp. zitiert in (Zucker, 2001)) ebenso wie eine Melatoninbehandlung im Herbst einen Phasenvorschub der circannualen Rhythmik zur Folge (Zucker, 2001), während beide Behandlungen im Frühjahr keinen Effekt hatten. Außerdem führte eine Östrogenbehandlung ovariectomierter Goldmantelziesel im Herbst zu einer Verkürzung der circannualen Periodenlänge und im Frühjahr zu einer Verlängerung (Lee und Zucker, 1992). Dieser Effekt blieb auch in den folgenden Jahren bestehen, was eindeutig auf einen synchronisierenden Effekt von Östrogen hinweist. Auch der jährliche Zyklus der LH-Sekretion konnte bei pinealektomierten Schafen mit lediglich einer begrenzten Periode von Melatonininfusionen pro Jahr auf ein Jahr synchronisiert werden (Woodfill et al., 1991; Woodfill et al., 1994). Allerdings war der Erfolg der Behandlung jahreszeitenabhängig. Pinealektomierte Schafe, die über die Dauer von einem Vierteljahr Melatonininfusionen entsprechend der normalen jahreszeitlichen Melatoninsekretion erhielten, konnten nur durch Infusionen im Sommer präzise auf ein natürliches Jahr synchronisiert werden. Infusionen im Frühjahr führten zwar zu einer Synchronisation zwischen den Tieren, aber die Phasenlage war vorverschoben, während es nach Infusionen im Herbst nur eine schwache, leicht verzögerte Synchronisation und im Winter gar keine Synchronisation mehr gab (Woodfill et al., 1994). Die Ergebnisse der Arbeiten an verschiedenen circannualen Spezies zeigen, dass

1. die Empfindlichkeit des circannualen Systems für photoperiodische Informationen nicht zu jeder Jahreszeit gleich ist, sondern, dass es analog zur circadianen PRC sensitive Phasen im Jahresverlauf gibt,
2. und dass außerdem nicht der komplette Zeitgeberzyklus für die Synchronisation des Jahresrhythmus notwendig ist. Analog zum circadianen Rhythmus sind für die Synchronisation circannualer Rhythmen kurze Phasen photoperiodischer Information vollkommen ausreichend.

2.4.3.2 Mediation der photoperiodischen Information durch Melatonin

Da eine neuronale Struktur als Sitz des circannualen Schrittmachers noch nicht identifiziert ist, bleibt die Frage offen, ob eine direkte neuronale Verbindung zur Retina existiert. Bei photoperiodischen Spezies konnte gezeigt werden, dass die komplette neuronale Verbindung von der Retina bis zum Pinealorgan für die Vermittlung photoperiodischer Information nötig

ist (Reiter, 1972; Hoffmann und Kuderling, 1975; Rusak und Morin, 1976; Lehman et al., 1984). Inzwischen ist auch bekannt, dass das circadiane System für die Synchronisation circannualer Rhythmen von großer Bedeutung ist. Läsionen vom SCN (Lee und Zucker, 1991) oder Pinealektomie bei Goldmantelziesel (Hiebert et al., 2000) oder Schafen (Bittman et al., 1983) führten zum Verlust der Fähigkeit auf natürliche und künstliche Photoperioden zu synchronisieren, obwohl der circannuale Rhythmus bestehen blieb.

Die jahreszeitlichen Veränderungen in der Photoperiode und damit in der Nachtlänge führen zu einer saisonalen Veränderung einzelner Parameter des Melatoninsignals. In nahezu allen bisher untersuchten Spezies führt eine Verlängerung der Nacht zu einer Zunahme der Dauer des nächtlichen Melatoninpeaks bis zu einem speziesabhängigen Maximum, das auch bei extrem langer Photoperiode nicht überschritten wird (Simonneaux und Ribelayga, 2003). Ob diese Verlängerung den Beginn oder das Ende der Melatoninproduktion betrifft, ist ebenfalls speziesabhängig. Beim Feldhamster ist der Zeitraum zwischen Nachtbeginn und Beginn des nächtlichen Anstiegs in der Melatoninsynthese unter kurzer Photoperiode geringer als unter langer Photoperiode. Wie bei allen saisonalen Spezies wird auch beim Feldhamster das Melatoninsignal nur während langer Photoperiode am Nachtende durch Licht begrenzt, d. h., dass mit zunehmender Nachtlänge die Differenz zwischen Ende des Melatoninpeaks und Ende der Nacht zunimmt (Vivien-Roels et al., 1997; Garidou et al., 2003). Bei vielen Spezies variiert auch die Amplitude des Melatoninsignals, z. B. ist beim Feldhamster die Amplitude der Melatoninausschüttung im Winter nahezu zehnmal höher als im Sommer (Vivien-Roels et al., 1992; Vivien-Roels et al., 1997). Es wird angenommen, dass die saisonalen Veränderungen des Melatoninsignals auf Veränderungen im Muster von NAT und HIOMT beruhen (Simonneaux und Ribelayga, 2003) (Abb. 9). Während NAT die Melatoninsynthese „an- und abschaltet“ und damit unter verschiedenen Photoperioden eine unterschiedliche Dauer im Melatoninsignal verursacht, ist HIOMT für die photoperiodischen Veränderungen in der Amplitude verantwortlich (Ribelayga et al., 1998; Ribelayga et al., 2000; Simonneaux und Ribelayga, 2003). Beim Feldhamster konnte gezeigt werden, dass die Amplitude des Melatoninpeaks nicht nur von HIOMT, sondern auch entscheidend von der NAT-Aktivität abhängt (Garidou et al., 2003). Der schwache nächtliche Anstieg des Melatonins unter langer Photoperiode konnte durch Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren erhöht werden, so dass die extrem niedrige Melatoninamplitude beim Feldhamster während des Sommers vermutlich auf einen schwachen noradrenergen Input zurückzuführen ist (Garidou et al., 2003) und damit auf eine veränderte Steuerung durch den SCN.

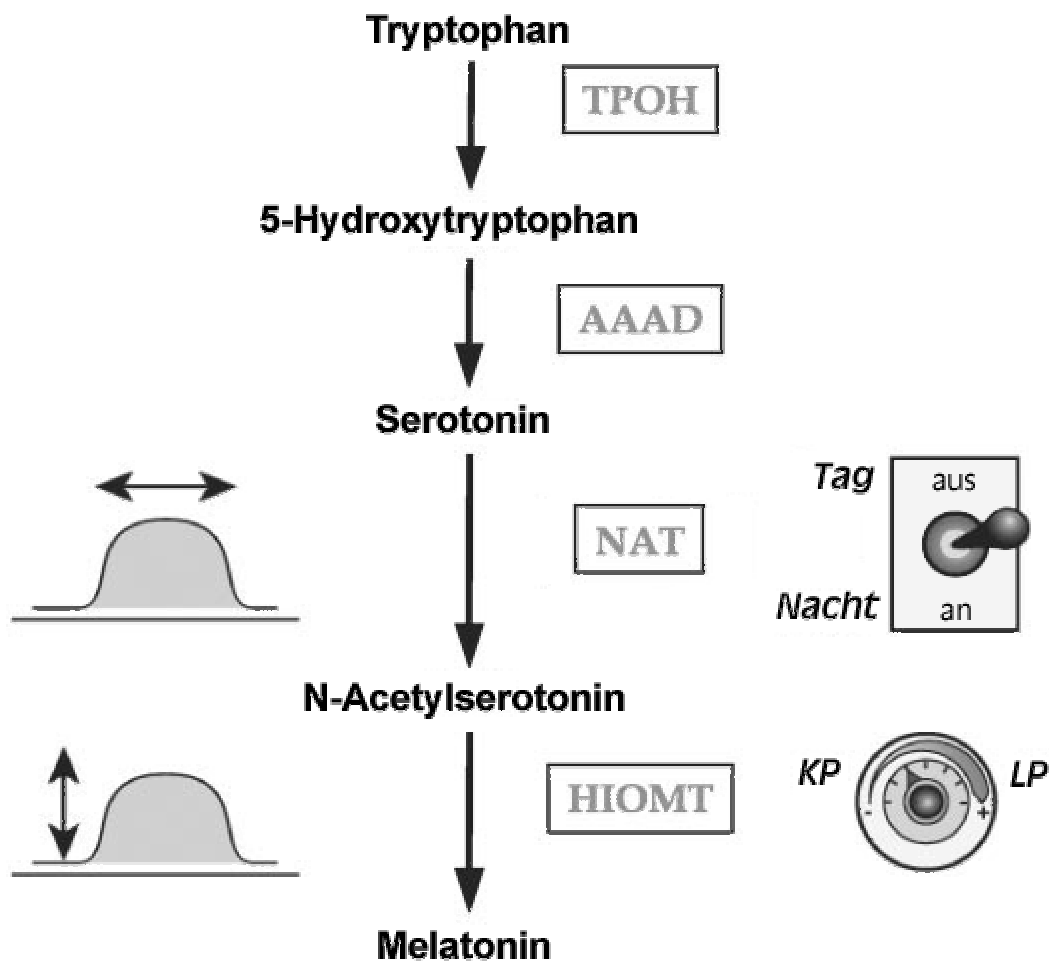


Abb. 9: Allgemeine, schematische Darstellung der Funktion von N-Acetyltransferase (NAT) und Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) in der tages- und jahreszeitlichen bzw. photoperiodischen Regulation der Melatoninsynthese. Der dramatische Anstieg der NAT-Aktivität zu Nachtbeginn und der scharfe Abfall am Ende der Nacht steuert die Dauer des Melatoninsignals, während photoperiodische Variationen in der HIOMT-Aktivität die Amplitude des Melatoninpeaks beeinflussen. TPOH = Tryptophan-Hydroxylase, AAAD = Aromatische-L-Aminosäure Decarboxylase, KP = Kurze Photoperiode, LP = Langes Photoperiode (Abb. aus (Simonneaux und Ribelayga, 2003), übersetzt und modifiziert)

Da die Dauer der nächtlichen Melatoninproduktion positiv mit der Nachtlänge korreliert, stellt das Muster der Melatoninausschüttung ein endokrines Signal für die Nachtlänge dar und beinhaltet so circadiane und saisonale Information für den Organismus (Steinlechner, 1992; Reiter, 1993). Experimentell konnte gezeigt werden, dass das zentrale Nervensystem über die Veränderungen im Melatoninmuster in der Lage ist, photoperiodische Informationen zu integrieren. Kurze oder langanhaltende tägliche Melatonininfusionen werden als photoperiodische Information interpretiert und führen zu einer Kurztag- bzw. Langtagantwort

des reproduktiven Systems (Bartness und Goldman, 1989; Ahrendt, 1995d; Pévet et al., 1996). Melatonin stellt somit ein humorales Bindeglied zwischen den retinorezipienten SCN-Neuronen und den circannualen Oszillatoren her und ist essentiell für die Vermittlung photoperiodischer Information auf die reproduktive Achse (Simonneaux und Ribelayga, 2003). Genau wie die Photoperiode hat Melatonin sowohl eine synchronisierende als auch eine phasenverschiebende Wirkung auf die circannuale Rhythmik (Woodfill et al., 1991; Woodfill et al., 1994; Zucker, 2001).

Bei Säugetieren ist wahrscheinlich der MT1-Melatoninrezeptor-Subtyp an der Vermittlung photoperiodischer Information beteiligt (Pévet, 2003). Wegen der großen interspezifischen Variabilität in Anzahl und Vorkommen von Melatoninrezeptoren (Masson-Pévet et al., 1994a) ist noch nicht ganz klar, was die Zielstrukturen des Melatoninsignals sind, die die photoperiodenabhängigen saisonalen Funktionen und insbesondere den jährlichen Reproduktionszyklus regulieren (Pévet, 2003). Neben dem SCN wurden lediglich in der *Pars tuberalis* (PT) der Hypophyse in allen bisher untersuchten Säugetierspezies eine hohe Melatoninrezeptordichte gefunden (Pévet, 2003). Die PT könnte als Zielstruktur der jahreszeitlichen Information des Melatoninsignals von Bedeutung sein, denn sie zeigt bei saisonalen Tieren im Gegensatz zu nicht-saisonalen Tieren einen annualen Rhythmus in der Melatoninrezeptordichte (Masson-Pévet und Gauer, 1994; Gauer et al., 1994a) und außerdem kontrolliert die PT die saisonale Ausschüttung des gonadotropen Hormons Prolactin (Morgan et al., 2000). Wahrscheinlich wirkt Melatonin aber auf mehrere Strukturen gleichzeitig, um die photoperiodische Information auf den saisonalen Reproduktionszyklus und andere saisonale Rhythmen zu übermitteln (Pévet, 2003). Ein Argument für diese Hypothese ist, dass nicht alle Arten saisonaler Rhythmen bei allen Spezies ausgeprägt sind. Weiterhin sind vermutlich verschiedene Mechanismen bei *longday breedern* und *shortday breedern* und bei photoperiodischen und circannualen Spezies involviert, was auch die große interspezifische Variabilität bei den Melatoninrezeptoren erklären könnte.

Verschiedene Hypothesen versuchen die Effektivität des Melatoninsignals als photoperiodisches Signal zu erklären (Simonneaux und Ribelayga, 2003). Dabei werden vier Parameter des Melatoninsignals diskutiert: die Amplitude, die Dauer, die Gesamtmenge (als Produkt aus Dauer und Amplitude) und die Phase. Außer, dass bei vielen Spezies die Amplitude des Melatoninsignals saisonalen Veränderungen unterliegt, spricht für die Hypothese der Amplitude, dass sie neben der Photoperiode auch durch die Temperatur

modifiziert werden kann. Eine Absenkung der Temperatur führt neben einem Anstieg der Enzymaktivität im Pinealorgan und einem Anstieg der Melatoninproduktion auch zu einer Beschleunigung der Gonadenregression (Vivien-Roels et al., 1997; Larkin et al., 2002; Simonneaux und Ribelayga, 2003). Dass eine Gonadenregression durch Melatonininfusionen, die in ihrer Dauer einem Kurztagssignal entsprechen, unabhängig von der Tageszeit der Behandlung induziert werden kann, spricht für das Modell der Dauer (Reiter, 1987; Pévet et al., 1996; Simonneaux und Ribelayga, 2003). Die Phasenlage des Melatoninsignals könnte ebenfalls für die Übermittlung der photoperiodischen Information wichtig sein, wenn es eine tägliche sensitive Phase für Melatonin gibt. So führen Melatonininjektionen unter Langtagbedingungen nur abends zu einer Gonadenregression, während morgendliche Injektionen wirkungslos sind (Simonneaux und Ribelayga, 2003) (Abb. 10).

Diese sensitive Phase für Melatonin ist möglicherweise durch Melatonin selbst gesteuert (Pévet et al., 1996). Überzeugende Beweise für diese Hypothese lieferte eine Studie an Goldhamstern, in der gezeigt werden konnte, dass zwei 2,5stündige Melatonininfusionen im Abstand von 3 h genauso eine Gonadenregression auslösen wie eine 10 h dauernde Infusion, egal zu welcher Tageszeit die fraktionierte Infusion stattfand. Dagegen ist eine 5 h dauernde Infusion unwirksam, ebenso wie eine Trennung der beiden Melatoninsignale um 5,5 h (Pitrosky et al., 1995; Pitrosky und Pévet, 1997). Die erste Infusion dient nach dieser Theorie der Synchronisation des melatoninsensitiven Rhythmus. Zur Gonadenatrophie kommt es nur, wenn das zweite Signal zeitlich mit der sensitiven Phase für Melatonin zusammenfällt. Unter natürlichen Bedingungen steuert das Melatonin, das zu Beginn der Nacht gebildet wird, diesen Sensitivitätsrhythmus, so dass es nur dann zu einer Gonadenregression kommt, wenn die Dauer der nächtlichen Melatoninausschüttung lang genug ist, um mit der sensitiven Phase zusammenzufallen. Dieses Modell erklärt auch, warum durch Kurztag-Melatonininfusionen unabhängig von der Tageszeit Gonadenregressionen ausgelöst werden können (Pévet et al., 1996).

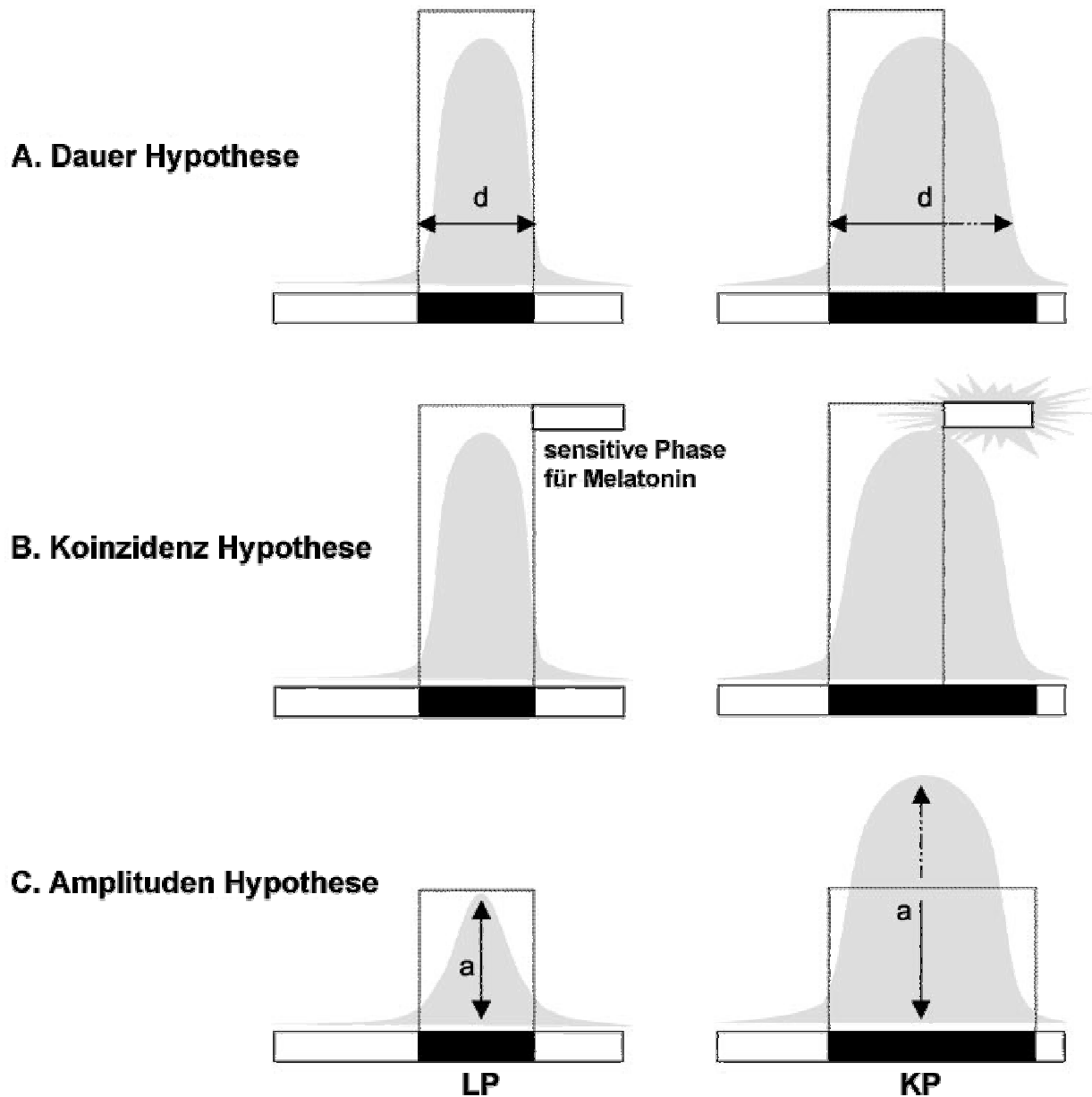


Abb. 10: Schematische Darstellung der verschiedenen Theorien zur Entschlüsselung der photoperiodischen Botschaft des Melatoninsignals. Das Melatoninsignal erfährt in Abhängigkeit von der Photoperiode substantielle Veränderungen in seiner Dauer und Amplitude. Photoperiodische Reaktionen könnten von Veränderungen in der absoluten Dauer des Melatoninsignals (A), von seinem Zusammentreffen mit einer sensitiven Phase (B) oder von der Höhe der Amplitude (C) abhängen. LP = Lange Photoperiode, KP = kurze Photoperiode, d = Dauer, a = Amplitude. (Abb. aus (Simonneaux und Ribelayga, 2003), übersetzt)

2.4.3.3 Intrinsische Veränderungen des SCN in Abhängigkeit von der Photoperiode

Saisonale Veränderungen im Aktivitätsmuster und in der Melatoninrhythmik vieler Spezies deuten darauf hin, dass der SCN selbst durch die Photoperiode beeinflusst wird (Pévet et al., 1996). So hat der SCN offensichtlich ein Gedächtnis für photoperiodische Information. Die Unterschiede im Melatoninmuster, die man unter verschiedenen Photoperioden beobachtet, bleiben auch unter anschließenden konstanten Bedingungen (Wehr et al., 1993) oder während einer akut ausgedehnten Nacht mindestens noch einen weiteren Tag bestehen (Matthews et al., 1992; Guerin und Matthews, 1998). Der Effekt von einem nächtlichen Lichtpuls ist in der folgenden Nacht sogar noch stärker (Lerchl, 1995). Ferner ist eine intrinsische Eigenschaft des circadianen Systems, nämlich der circadiane Rhythmus der Lichtsensitivität (gemessen an der Expression von c-Fos), von der Photoperiode abhängig (Pévet et al., 1996). Sowohl bei der nicht-saisonalen Ratte (Sumová et al., 1995) als auch beim photoperiodischen Goldhamster und dem circannualen Feldhamster (Vuillez et al., 1996) ist die Dauer der lichtinduzierbaren c-Fos-Expression proportional zur Nachtlänge. Während sie bei der Ratte unter LD08:16 fast doppelt so lang wie unter LD16:08 ist, ist die maximale Phase, in der c-Fos beim Feldhamster induzierbar ist, auf 13 h beschränkt. Bei einem Transfer von langer in kurze Photoperiode dehnt sich die Fos-immunoreaktive Phase graduell aus. Interessanterweise dauert es bis zur maximalen Ausdehnung genauso lange wie auch das Melatonin- und Aktivitätsmuster brauchen, um beim gleichen Transfer die maximale Extension zu erreichen (Sumová et al., 1995; Vuillez et al., 1996). Außerdem wird bei Mäusen das circadiane Muster der *Per1*- und *Per2*-Expression im SCN durch die Photoperiode beeinflusst (Steinlechner et al., 2002). Bei Goldhamster und Sibirischen Hamster ist die Dauer der *Per1*-Transkription im SCN und in der PT proportional zur Photoperiode, (Messenger et al., 1999; Messenger et al., 2000). Im SCN ist dieser Effekt in vergleichbarer Weise auch auf Proteinlevel sichtbar und besteht unter nachfolgenden konstanten Bedingungen weiter (Nuesslein-Hildesheim et al., 2000). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Uhrgene auch Kalendergene sind (Schwartz et al., 2001). Die parallelen photoperiodisch verursachten Veränderungen in vier Parametern der circadianen Uhr, nämlich Aktivität, Melatonin, Lichtsensitivität und Uhrgenen, reflektieren vermutlich Veränderungen im SCN, der somit direkt an der Integration photoperiodischer Information der Umwelt beteiligt sein könnte (Pévet et al., 1996).

Die photoperiodische Information könnte den SCN neben den Projektionen des RHT und des GHT aufgrund seiner Melatoninrezeptoren zusätzlich über einen Rückkopplungsmechanismus des saisonal variierenden Melatoninsignals erreichen (Pévet et al., 1996). Dagegen ist eine Übertragung der photoperiodischen Information über Sexualhormone eher unwahrscheinlich. Obwohl viele saisonale Veränderungen von circadianen Parametern mit Änderungen im Reproduktionsstatus einhergehen, wurden bisher im SCN keine Steroidrezeptoren identifiziert (Pévet et al., 1996).

2.4.3.4 Photoperiodische Zeitmessung: Externes und internes Koizidenzmodell

Sehr wahrscheinlich erfolgt die Messung der Photoperiode direkt mit Hilfe der circadianen Uhr im SCN. In sogenannten Resonanzzyklen, in denen Goldhamstern unter Dauerdunkel in verschiedenen Intervallen 6stündige Lichtpulse verabreicht wurden, zeigten Tiere, bei denen Intervalle verwendet wurden, die 24 h oder einem Vielfachen davon entsprachen (LD06:18, LD06:42), eine Kurztagreaktion (Gonadenregression), während Resonanzzyklen, die in abweichenden Zykluslängen resultierten (LD06:30, LD06:54) zu einer Langtagantwort (Gonadenausbildung) führten (Elliott et al., 1972). Ein Resonanzzyklus mit einer von 24 h abweichenden Periodenlänge führt dazu, dass in bestimmten Abständen Licht in die subjektive Nacht fällt, was dann eine Langtagantwort zur Folge hat. Dsungarische Zwerghamster, die ihre circadiane Aktivitätsrhythmik auf verschiedene T-Zyklen mit von 24 h abweichender Periodenlänge synchronisieren, zeigten ebenfalls in Abhängigkeit vom Phasenwinkel der Synchronisation eine Kurztag- bzw. Langtagreaktion. Tiere, deren Aktivität nach dem Ende des synchronisierenden einstündigen Lichtpulses begann, zeigten eine Kurztagreaktion, während Tiere, die während des Lichtpulses aktiv wurden, mit einer Langtagantwort reagierten (Elliott 1981; Darrow und Goldman, 1985). Die Ergebnisse dieser Arbeiten lassen den Schluss zu, dass nicht die Gesamtdauer von Licht oder Dunkelheit pro 24 h, sondern das circadiane Timing des Lichtsignals der kritische Parameter für die photoperiodische Zeitmessung ist und dass der SCN direkt in diesen Mechanismus involviert sein muss. Dafür spricht ferner, dass eine Wiederausbildung der Gonaden unter einer kurzen Photoperiode durch einen einzigen einminütigen Lichtpuls während der Nacht erreicht werden kann (Hoffmann, 1979; Lerchl, 1995).

In der Vergangenheit wurden zwei Modelle für die Wahrnehmung der Photoperiode durch das circadiane System entwickelt. Das externe Koinzidenzmodell wurde von Bünning (1936) vorgeschlagen und von Pittendrigh und Minis (1964) weiterentwickelt. Nach diesem Modell (*reviewed* in (Goldman, 2001)) hängen photoperiodische Reaktionen von der Koinzidenz zwischen Licht und einer bestimmten induktiven Phase des circadianen Oszillators ab. Wird die induktive Phase belichtet, kommt es zu einer Langtagantwort, liegt sie dagegen in der Nachtphase, kommt es zu einer Kurztagreaktion. Dabei entspricht die induktive Phase im Wesentlichen der Phase des circadianen Zyklus, in der Licht eine Phasenverschiebung des circadianen Schrittmachers verursacht, also dem Beginn und dem Ende der subjektiven Nacht. Für die photoperiodische Zeitmessung nach dem externen Koinzidenzmodell ist daher neben der induktiven Phase auch die präzise Synchronisation des circadianen Systems auf den Licht-Dunkel-Zyklus von entscheidender Bedeutung. Unter natürlichen Bedingungen wird die induktive Phase aufgrund der saisonalen Schwankungen in der Photoperiode zu bestimmten Jahreszeiten belichtet und zu anderen nicht, was letztendlich zu einer Synchronisation circannualer Zyklen mit dem natürlichen Jahr führt (Abb. 11).

Eine systematische Veränderung in der Belichtung der induktiven Phase kann aber auch unter konstanten photoperiodischen Bedingungen erfolgen, nämlich dann, wenn die Phasenbeziehung ψ zwischen dem circadianen Rhythmus und dem Zeitgeberzyklus saisonalen Schwankungen unterliegt. So kommt es bei Goldmantelziesel (Lee et al., 1986; Lee und Zucker, 1995) und verschiedenen Vogelarten (Gwinner, 1986) im subjektiven Frühjahr zu einem spontanen Wechsel von einem negativen Phasenwinkel, d. h. der Aktivitätsbeginn folgt dem Zeitgebersignal, so dass die induktive Phase nicht belichtet wird, zu einem positiven Phasenwinkel des Aktivitätsbeginns, d. h. der Aktivitätsbeginn erfolgt vor dem Zeitgebersignal, wobei die induktive Phase belichtet wird. Später im Jahr wird die ursprüngliche Phasenbeziehung wieder hergestellt. Eine Veränderung im Phasenwinkel führt dann ebenfalls zu der Interpretation, dass die Tageslichtlänge sich verändert hat (Goldman, 2001). Daher ist ein sauberer Nachweis von circannualen Rhythmen nur unter Dauerlicht oder Dauerdunkel möglich, weil im Prinzip jede Photoperiode in Abhängigkeit vom Phasenwinkel ψ des synchronisierten circadianen Rhythmus ein exogenes photoperiodisches Signal liefern und so den circannualen Zyklus immer wieder neu anstoßen könnte.

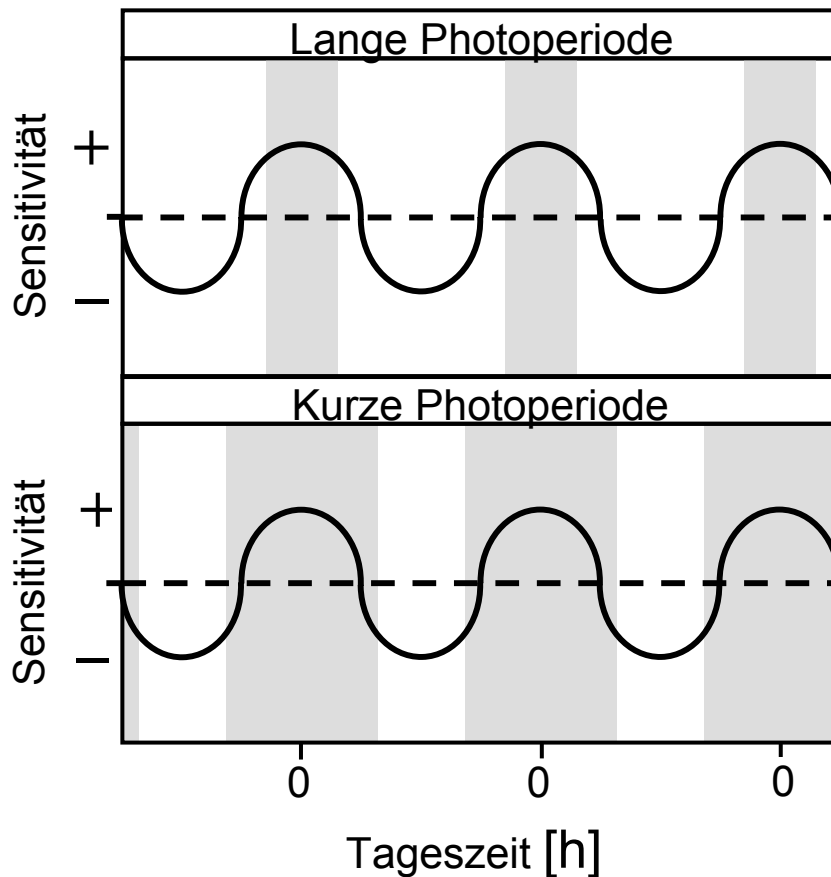


Abb. 11: Synchronisation des circannualen Zyklus nach dem externen Koinzidenzmodell. Die sensitive Phase für photoperiodische Information ist grob auf die subjektive Nacht beschränkt. Zu einer Langtagreaktion kommt es, wenn diese sensitive Phase bei langer Photoperiode oder im Frühjahr am Beginn und Ende der subjektiven Nacht belichtet wird (obere Graphik). Bleibt diese Phase bei kurzer Photoperiode oder im Herbst im Dunkeln, erfolgt eine Kurztagreaktion.

Die Theorie der zwei gekoppelten Oszillatoren (Pittendrigh und Daan, 1976b) bildet die Grundlage für das interne Koinzidenzmodell. Nach diesem Modell wird die aktuelle Photoperiode aus der Phasenwinkeldifferenz zwischen M- und E-Oszillator - also intern - gemessen. Jeder Oszillator hat seine eigene intrinsische Periode τ und seine eigene PRC, so dass die Synchronisation durch Licht separat erfolgt (Boulos und Rusak, 1982; Illnerová und Vanecek, 1982; Illnerová, 1991). Allerdings sind beide Oszillatoren untereinander gekoppelt, so dass ihre Phasenbeziehung nicht beliebig variabel ist. Nach dem Modell ist $\tau_E < \tau_M$ (Pittendrigh und Daan, 1976b), weshalb die Phasenwinkeldifferenz der Oszillatoren die

Tendenz hat auseinander zu driften, wenn sie nicht durch die Lichtphase begrenzt wird. So koppelt der M-Oszillator unter natürlichen Bedingungen immer an Sonnenaufgang und der E-Oszillator immer an Sonnenuntergang, so dass ihre Phasenbeziehung eine Funktion der Tageslichtlänge ist und damit eine präzise Messgröße für die Jahreszeit (Abb. 12).

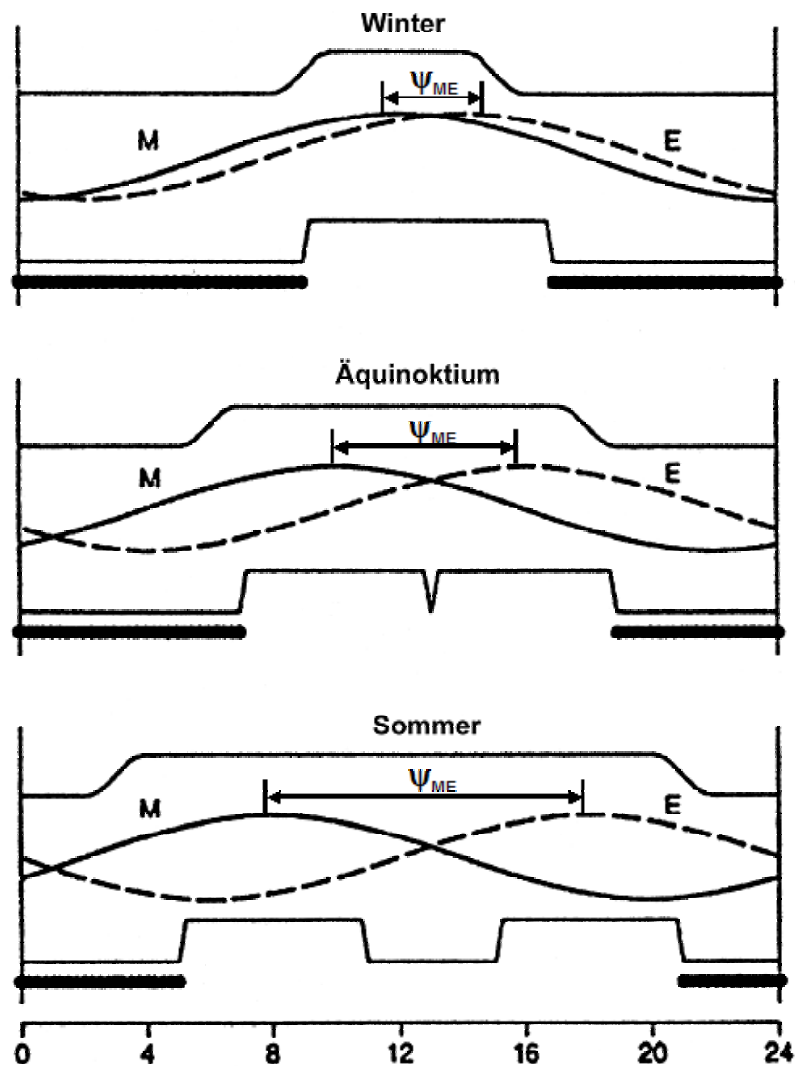


Abb. 12: Photoperiodische Zeitmessung nach dem internen Koinzidenzmodell. M- und E-Oszillator (E und M) driften bei zunehmender Photoperiode (jeweils die obere Kurve) auseinander, so dass sich ihr Phasenwinkel zueinander (ψ_{ME}) verändert. Die unteren Kurven zeigen jeweils die nach dem internen Koinzidenzmodell vorhergesagten Peaks in der elektrischen Aktivität und die schwarzen Balken die vorhergesehene Aktivitätsphase (Abb. aus (Daan et al., 2001), modifiziert)

Wenn man annimmt, dass der E-Oszillator sowohl Aktivitätsbeginn als auch den Beginn der Melatonin synthese steuert, während der M-Oszillator beide Prozesse beendet, erklärt sich auch die Verlängerung der Aktivitätsdauer und der Dauer der Melatoninsekretion bei einem Transfer von langer in kurze Photoperiode (Gorman et al., 1997). Das interne Koinzidenzmodell wurde bereits durch eine Reihe von experimentellen Befunden untermauert: So ergaben Messungen der elektrischen Aktivität in rostro-caudalen SCN-Schnitten zwei deutlich voneinander getrennte Maxima, von denen das eine Maximum unter verschiedenen Photoperioden an Licht-aus und das andere an Licht-an gekoppelt war (Jagota et al., 2000). Ferner wurde bei Ratten anhand der lichtinduzierten c-Fos Expression im SCN gezeigt, dass Licht den Beginn und das Ende der subjektiven Nacht unabhängig voneinander verschieben kann (Sumová und Illnerová, 1998). Außerdem führt ein Lichtpuls in der späten subjektiven Nacht zu einem sofortigen Vorschub des morgendlichen Endes der NAT-Aktivität im Pinealorgan, was den M-Oszillator reflektiert, während der abendliche Anstieg der NAT-Aktivität, ausgelöst durch den E-Oszillator, erst nach einigen Tagen die neue Phasenlage erreicht hat (Illnerová, 1991). Ähnliche unterschiedliche Reaktionen des M- und E-Oszillators wurden auch bei Goldhamstern für die Dauer des nächtlichen Melatoninpeaks und der Aktivität beobachtet (Elliott und Tamarkin, 1994).

2.5 Fragestellung

Die meisten Daten, die inzwischen zur saisonalen Rhythmik des Europäischen Feldhamsters vorliegen, weisen darauf hin, dass es sich um eine echte circannuale Spezies handelt. Zum einen ist der Feldhamster – im Gegensatz zu photoperiodischen Arten – in der Lage, endogen in die sexuelle Ruhephase überzutreten (Masson-Pévet et al., 1994b) und zum anderen wurden sowohl für den Körpergewichts- als auch für den Reproduktionszyklus schon mehr als 2 komplette Zyklen unter konstanten Bedingungen beobachtet (Canguilhem, 1989; Masson-Pévet et al., 1994b). Die Periodenlängen waren dabei sehr variabel. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie diese circannualen Rhythmen präzise auf ein Jahr synchronisiert werden können.

2.5.1 Experiment 1

Wie oben beschrieben, ist für zwei circannuale Spezies bekannt, dass nicht der komplette Zeitgeberzyklus zur Synchronisation der endogenen Rhythmik notwendig ist, und zwar für das Schaf (Woodfill et al., 1991; Woodfill et al., 1994), und der Goldmantelziesel (Hiebert et al. in Präp. zitiert in (Zucker, 2001), Lee and Zucker, 1992). Für den Feldhamster wurde inzwischen ebenfalls gezeigt, dass eine kurze Photoperiode nur zu einer bestimmten Jahreszeit, nämlich von Mitte Mai bis Mitte Juli, zu einer Gonadenregression führt. In diesem Zeitraum hat die Photoperiode einen synchronisierenden Einfluss auf die endogene Jahresrhythmik (Saboureau et al., 1999). Zu einem früheren Zeitpunkt im Jahr sind die Tiere unempfindlich gegenüber kürzeren Photoperioden. Unter natürlichen Bedingungen wird offensichtlich ein markanter Punkt in der sinusförmigen Oszillation der natürlichen Photoperiode sowohl als Wintersignal als auch als Zeitgeber zur Synchronisation des kompletten Zyklus genutzt, und zwar der Übergang von ansteigender in abfallende Photoperiode um die Sommersonnenwende am 21. Juni. Im circadianen System werden aber nach dem nicht-parametrischen *entrainment*-Modell zwei Zeitpunkte des Tagesrhythmus zur Synchronisation genutzt: Der Sonnenuntergang und der Sonnenaufgang. Die vielen Analogien, die bisher zwischen dem circannualen und dem circadianen System beschrieben wurden, lassen vermuten, dass auch für die Synchronisation des circannualen Systems noch ein zweiter markanter Zeitpunkt im Jahreszyklus der natürlichen Photoperiode genutzt wird.

Am wahrscheinlichsten dafür erscheint der Übergang von abnehmender in zunehmende Photoperiode zur Wintersonnenwende am 21. Dezember. Folgende Frage sollte im ersten Teil der Arbeit geklärt werden:

⇒ Gibt es eine sensitive Phase für lange Photoperioden im Winter?

Der Nachweis von einer zweiten sensitiven Phase und damit der indirekte Nachweis einer zweiten nicht-sensitiven Phase wäre außerdem ein weiterer Hinweis dafür, dass Feldhamster eine echte circannuale Rhythmik aufweisen. Bisher werden sie in der Literatur nicht zweifelsfrei zu den echten circannualen Spezies gezählt (Gwinner, 1986). Photoperiodische Spezies wie der Goldhamster oder der Dsungarische Zwerghamster würden dagegen zu jedem Zeitpunkt im Jahr auf einen Wechsel in der Photoperiode reagieren.

2.5.2 Experiment 2

Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigte sich mit dem Einfluss künstlicher Photoperioden auf das circannuale System. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf natürliche Bedingungen ist allerdings - obwohl wahrscheinlich - doch spekulativ. Im zweiten Teil der Arbeit geht es um die Synchronisation saisonaler Rhythmen in natürlicher Photoperiode unter besonderer Berücksichtigung der Rolle des circadianen Systems im Synchronisationsprozess. Für die Beteiligung des SCN und vor allem des Hormons Melatonin an der Synchronisation circannualer Rhythmen gibt es unzählige Hinweise (Pévet et al., 1996; Pévet, 2003). Auch beim Feldhamster gibt es Hinweise, dass das circadiane System am Synchronisationsprozess beteiligt ist, denn die Tiere zeigen z. B. nur um die Sommersonnenwende einen klaren Aktivitätsrhythmus, während sie im übrigen Jahr mehr oder weniger arrhythmisch sind (Wollnik et al., 1991). Außerdem wurde eine ausgeprägte saisonale Rhythmik im Muster der nächtlichen Melatoninausschüttung nachgewiesen (Vivien-Roels et al., 1992). Eine klare Tag-Nacht-Rhythmik konnte nur während des Winterhalbjahrs beobachtet werden. Unter einer künstlichen Photoperiode von LD16:08, wie sie natürlicherweise in unseren Breiten etwa um den längsten Tag vorkommt, fehlte ein nächtlicher Anstieg in der Melatoninproduktion (Vivien-Roels et al., 1997; Vivien-Roels et al., 1998). Möglicherweise laufen diese Veränderungen von Melatonin und Aktivität um den längsten Tag parallel ab, was auf eine intrinsische Veränderung des SCN hinweist. Es stellt sich die Frage:

⇒ Korrelieren diese Veränderungen im circadianen System mit der von (Saboureau et al., 1999) gefundenen annualen sensitiven Phase für kurze Photoperioden?

Eine Korrelation wäre ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Sensitivität des circannualen Systems für photoperiodische Information auf eine besondere Konfiguration des circadianen Systems zurückzuführen ist und dass damit das circadiane System am Synchronisationsprozess der circannualen Rhythmik beteiligt ist.

3

Ergebnisse

Sämtliche Tierexperimente dieser Arbeit erfolgten nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Stuttgart (AZ 35-9185.81/0110 vom 01.09.97 und AZ 35-9185.81/0179 vom 04.04.2002) und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes.

3.1 Experiment 1

- **European hamsters (*Cricetus cricetus*) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression.**

In einer überarbeiteten Version im Druck bei *Biology of Reproduction*. Online veröffentlicht am 21. Januar 2004 (DOI 10.1095/biolreprod.103.023002).

3.2 Experiment 2

- **The two physiological identities of the common hamster (*Cricetus cricetus* L.) – a race against the time of year**

Veröffentlicht in *Jahrbücher des nassauischen Vereins für Naturkunde* 122:209-213 (Monecke, 2001)

In dieser Arbeit sind die Ergebnisse einer Vorabauswertung von Experiment 2 dargestellt, anlässlich der 9ten Tagung des Internationalen Arbeitskreises Feldhamsterschutz in Bacharach vom 20.10. bis 21.10.2001

- **Seasonal variations in circadian rhythms characterize a phase of sensitivity to short photoperiods in the European hamster, *Cricetus cricetus***

In Vorbereitung zur Veröffentlichung beim *Journal of Comparative Physiology [B]*

European hamsters (*Cricetus cricetus*) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression¹

Stefanie Monecke and Franziska Wollnik

Biological Institute, Department of Animal Physiology, University of Stuttgart,
Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Germany

Running title: Phase of Insensitivity to Long Photoperiods

Keywords: European hamster, seasonal reproductive cycle, entrainment, photoperiod

Address for correspondence:

Franziska Wollnik

Biological Institute

Dept. of Animal Physiology

University of Stuttgart

Pfaffenwaldring 57

70550 Stuttgart, Germany

Phone: ++49-711-685-5001

Fax: ++49-711-685-5090

e-mail: Franziska.Wollnik@po.uni-stuttgart.de

¹ Supported by the German Research Foundation (DFG, Wo354/12-1)

ABSTRACT

Annual rhythms of body weight and reproduction in the European hamster (*Cricetus cricetus*) are the result of an interaction between seasonal changes in day length (photoperiod) and seasonal changes in the animal's responsiveness to these photoperiods. The present study demonstrates that under natural conditions European hamsters are not able to perceive long photoperiods (LD16:8) before mid-November. This is an important difference to other hamster species, in which regrowth of the gonads can be stimulated by exposure to long photoperiods at any stage of gonadal regression. The experiments also demonstrate the existence of an annual phase of sensitivity to long photoperiods, that starts around mid-November and extends until March/April. During this phase of sensitivity, exposure to a long photoperiod (LD16:8) induced gonadal development within 3 weeks. Additional experiments with an accelerated photoperiodic lighting regime (LD_{shift}) indicated that a photoperiod of approximately 13 hours is necessary to stimulate gonadal development. Under natural lighting conditions in Stuttgart (48°46' N), a photoperiod of 13 hours is reached by the beginning of April, which fits well with the finding that the majority of animals kept under LD_{nat} had well-developed gonads by the end of April. Nevertheless, these animals showed a rather variable timing of gonadal development, ranging from early January until late April. This is most likely the result of two processes, first an endogenous mechanism (photorefractoriness) that induces gonadal recrudescence without any photoperiodic information while the animals are still in their hibernation burrows, and second a direct stimulatory effect of long photoperiods.

INTRODUCTION

Over the past 30 years, the European hamster has become an interesting model for seasonal rhythms in the physiology of a true hibernator. European hamsters show pronounced annual changes in food intake and body weight [1-3], gonadal hormones and reproductive status [4] as well as melatonin secretion [5] and melatonin receptor density in the brain [6]. Research in our own lab has demonstrated seasonal rhythms in the daily pattern of locomotor activity [7] and body temperature [8].

Annual rhythms in body weight [1, 3] and reproductive state [9] persist in many European hamsters for more than one cycle despite the fact that the animals are kept under constant photoperiods. In addition, the majority of pinealectomized hamsters show at least two consecutive cycles in body weight and reproduction [9]. In this respect, European hamsters share more similarities with true circannual species [10], such as ground squirrels [11-13], marmots [14, 15] or sheep [16] than with photoperiodic species, such as the Syrian or Siberian hamster [17-20].

Under natural conditions, both circannual and photoperiodic species are entrained with the geophysical year by the regular changes in day length [10, 20]. As has been demonstrated in ewes [21, 22] and ground squirrels (Hiebert et al. (in prep.) cited in [10]) synchronization does not require the entire annual cycle. Instead, seasonal rhythms of reproductive activity can be entrained by exposing the animals to only one or two discrete blocks of photoperiodic information, as long as they fall into a sensitive phase. For the European hamster, such an annual phase of sensitivity to short photoperiods has already been demonstrated. Under natural conditions European hamsters are not able to perceive the short photoperiod before mid-May. The sensitive phase to short photoperiods starts at that time and extends to at least the middle of July, when natural photoperiods of less than 15.5 h induce gonadal regression [23].

Furthermore, there is experimental evidence for a complementary phase of sensitivity to long photoperiods during fall or winter. When animals were transferred from a natural photoperiod to a long photoperiod either in August or in October (after complete gonadal atrophy), regrowth of gonads was accelerated by about 2-5 months compared to animals kept under natural conditions [9]. In addition, the subsequent spontaneous regression of the gonads was

also phase advanced compared to control animals. These results suggest that the annual reproductive rhythm of European hamsters can be phase advanced by exposure to long photoperiods in winter. The aim of the present studies was to further characterize the complementary phase of sensitivity to long photoperiods during fall or winter, which may play an additional role in the synchronization of seasonal rhythms in the European hamster.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male and female European hamsters used for this study were obtained from our own breeding colony. All animals were born and raised under conditions of natural light (LD_{nat}) at Stuttgart (latitude 48°46' N), but constant temperature ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$). Food and water were given *ad libitum*. Body weight and gonadal status of the animals were checked once every two weeks (experiment 2) or once every three weeks (experiments 1 and 3) under a short enflurane anesthesia (Ethrane®, Abbot). The studies were performed in accordance with the National Research Council (NRC) publication *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (copyright 1996, National Academy of Science), the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the German law.

In our hands, breeding of European hamsters is limited to approximately 6-8 litters a year with an average of 4-8 pups each. Therefore, both males and females were used for the present study in order to obtain a sufficient number of animals in each experimental group. In males the beginning of gonadal development was defined by the descent of the testes into the scrotum, after which testis size was measured with a caliper-square through the scrotum. Palpation of testes and/or caliper-square measurement of testis size are standard procedures to determine the reproductive status of male hamsters [24]. It has been demonstrated for the European hamster that testis size correlates well with testis weight [9] and with plasma testosterone levels [4]. In female animals the beginning of gonadal development was defined by the first opening of the vagina verified by visual inspection. It has been demonstrated for Djungarian hamsters that there is a good correlation between ovarian cyclicity and the opening of the vagina [25]. In addition, preliminary studies in our own lab revealed that reproductive female European hamsters show regular estrous cycles with a cycle length of 4-5 days. In most animals, ovarian cyclicity started immediately after the opening of the vagina, and ended 1-2 weeks before its closure. Thus, it seemed safe to assume that the first opening of the vagina is a sufficiently good indicator for the beginning of reproductive activity.

Experiment 1: Timing of gonadal development under LD_{nat}

Between 1998 and 2001, a total of 40 animals (12 males, 28 females) were born in our breeding colony under LD_{nat} between mid-April and end of July (Table 1). These animals were kept under natural lighting conditions and served as a control group to verify the timing of the first gonadal development in the following spring, i.e., in the years 1999 to 2002. Body weight and gonadal status of the animals were checked regularly every three weeks.

Experiment 2: Effect of long photoperiods in winter

A total of 24 animals (14 males, 10 females), born under LD_{nat} between April and July 2001, were kept under LD_{nat} until September 2001 (Table 1). At that time, all animals had regressed gonads. Groups of 4 animals, randomly chosen from different litters, were transferred to long photoperiods (LD16:8, lights on from 4:00 h to 20:00 h) every 4 weeks from September 19, 2001 to January 9, 2002. A LD16:8 photoperiod is similar to the day length in Stuttgart during the summer solstice. One group stayed under LD_{nat} as a control. Additionally, one group of 4 animals (2 males, 2 females born in 2000) was transferred to an intermediate photoperiod (LD12:12, lights on from 6:00 h to 18:00 h) on November 8, 2001. At that time the natural photoperiod was approximately LD9:15. Thus the LD12:12 group experienced a 3 h increase of the photoperiod. Body weight and gonadal status of the animals were checked regularly every two weeks.

Experiment 3: Gonadal development under accelerated and semi-natural photoperiods

A total of 22 animals (12 males, 10 females), born and raised in July 2000 under LD_{nat}, were kept under LD_{nat} until the middle of August 2000 (Table 1). Two groups of 8 animals each were then transferred to a semi-natural photoperiod (LD_{semi-nat}) mimicking the natural lighting conditions of Stuttgart, i.e., light onset and offset of the artificial LD cycle were adjusted to the natural sunrise and sunset of Stuttgart once a week. Starting with December 27, one group was subjected to an accelerated semi-natural photoperiod (LD_{shift}), i.e., the timing of lights on and off was changed twice as fast. As a consequence, the seasonal photoperiodic cycle of one year was finished within 6 months (Fig. 1). Six animals were maintained in natural conditions (LD_{nat}) as controls. Body weight and gonadal status of the animals were checked regularly every three weeks.

Experiment	Group	Number of animals	Photoperiodic conditions	Date of transfer
1		40	LD _{nat}	
2	C	4	LD _{nat}	
	I	4	LD _{nat} → LD16:8	September 19, 2002
	II	4	LD _{nat} → LD16:8	October 17, 2002
	III	4	LD _{nat} → LD16:8	November 11, 2002
	IV	4	LD _{nat} → LD16:8	December 12, 2002
	V	4	LD _{nat} → LD16:8	January 9, 2002
	VI	4	LD _{nat} → LD12:12	November 8, 2002
3	LD _{semi-nat}	8	LD _{nat} → LD _{semi-nat}	August 8 - 17, 2000
	LD _{shift}	8	LD _{nat} → LD _{semi-nat}	August 8 - 17, 2000
			→ LD _{shift}	December 27, 2000
LD _{nat}	6	LD _{nat}		

Table 1: Summary of all experiments. For further details see text.

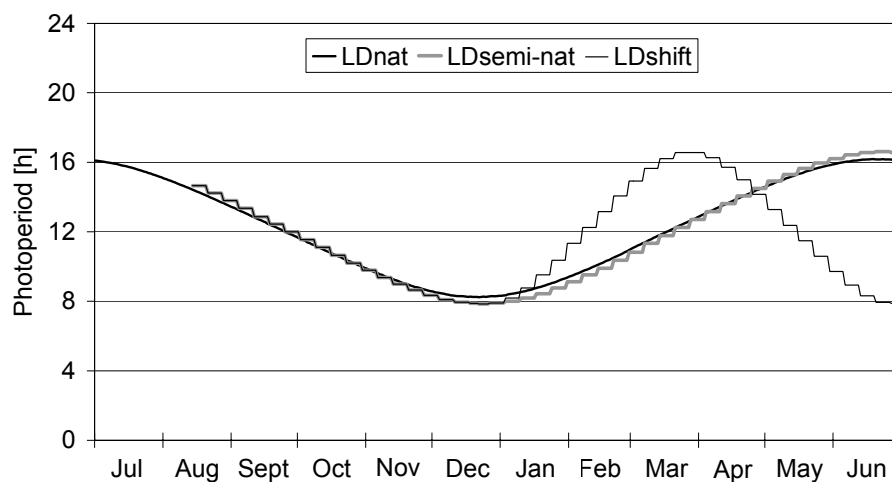


Fig. 1: Schematic representation of photoperiodic stimuli employed in experiment 3. Animals born and raised under LD_{nat} until the middle of August 2000 were then transferred to a semi-natural photoperiod (LD_{semi-nat}) mimicking the natural lighting conditions of Stuttgart. Starting on December 27, one of the groups was subjected to an accelerated semi-natural photoperiod (LD_{shift}), i.e., the timing of lights on and off was changed twice as fast. As controls, 6 animals were maintained in natural conditions (LD_{nat}).

Statistics

If not stated otherwise, data were analyzed using one- or two-way analyses of variance (ANOVA; Software: STATISTICA, StatSoft, Inc., Tulsa, OK 74104, USA). Where appropriate, Sheffé's multiple t-test or the LSD-test were used for post-hoc comparisons. Significant differences ($p \leq 0.05$) are indicated by one asterisk, highly significant differences ($p \leq 0.01$) by three asterisks. If not indicated otherwise, means \pm standard error of the mean ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) are given in text and figures.

RESULTS

Experiment 1: Timing of gonadal development under LD_{nat}

Animals born in our breeding colony during 4 consecutive years (1998 – 2001) under LD_{nat} between mid-April and end of July and kept under LD_{nat}, showed a rather high variability in the timing of gonadal development in the following spring (Fig. 2). The first animal became reproductive in late December (a male) and the last in early May (a female). Kruskal Wallis ANOVA by ranks revealed a highly significant difference between males and females ($p < 0.001$), but not between different years ($p = 0.31$). In general, development of gonads occurred earlier in males than in females. Gonadal development of females showed two distinct peaks, a first one together with the males around LD10:14 and a second one around LD13:11.

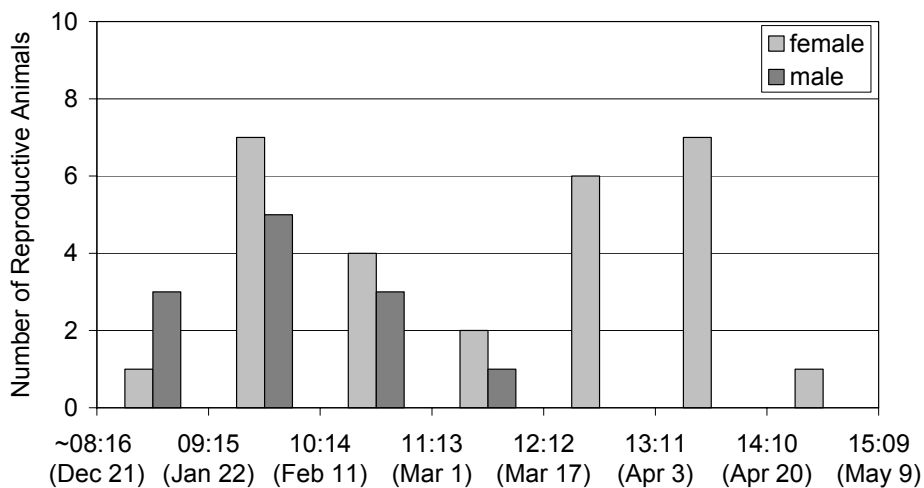


Fig. 2: Timing of gonadal development (first sign of reproductive activity) in female (n=28, light columns) and male (n=12, dark columns) European hamsters born and maintained under natural lighting conditions (LD_{nat}). Data were clustered in photoperiodic intervals (differences between sunrise and sunset at 48°46' N latitude).

Experiment 2: Effect of long photoperiods in winter

Transfer to a long photoperiod (LD16:8) accelerated the timing of gonadal development in all experimental groups (Fig. 3). In groups I, II, and III, gonads developed around the end of November. Animals of group II and III became reproductive almost simultaneously, whereas the timing of gonadal development was more variable in group I, i.e., the total range was 56 days compared to 0 and 14 days in groups II and III, respectively. In groups III, IV and V gonadal development occurred within 14 to 28 days after exposure to LD16:8. In contrast, control animals (C) kept permanently in LD_{nat} showed a rather variable timing of gonadal development, ranging from early January to the end of March. A two-way ANOVA revealed a highly significant difference between experimental groups ($F_{5,12} = 23.3$; $p < 0.001$), but no sex difference ($F_{1,12} = 1.03$; ns) in the timing of gonadal development, i.e., the number of days between the start of the experiment on September 1 and the first appearance of testes or the opening of the vagina.

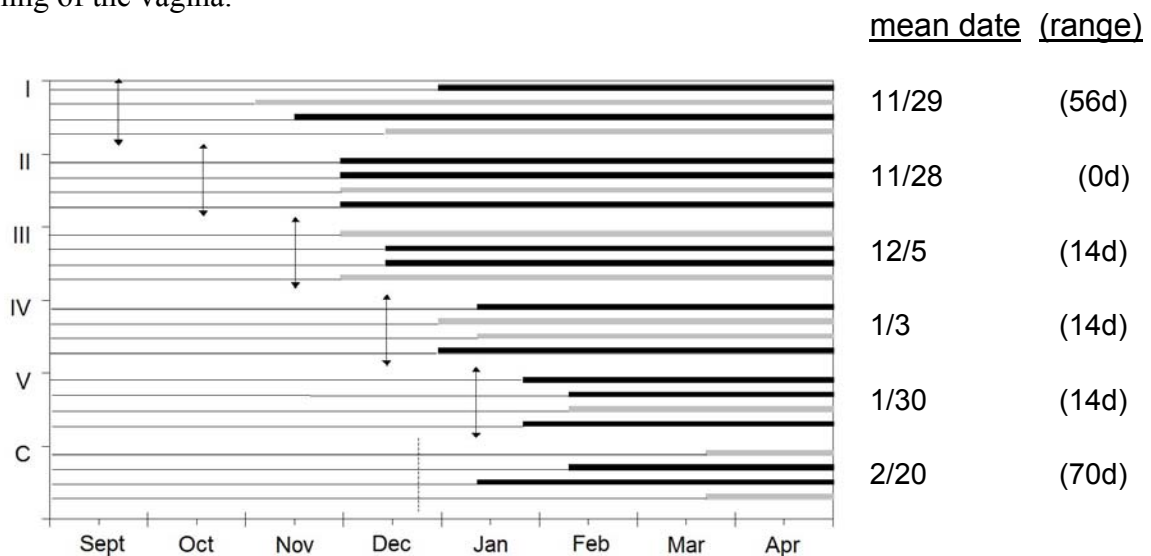


Fig. 3: Schematic representation of the effect of transfer to a long photoperiod at different times during winter. Times of transfer to LD16:8 are indicated by arrows. Control animals (group C) were kept under natural light conditions until the end of the experiment. The dashed line in group C marks the shortest day in the winter 2001/02, i.e., December 22, after which the photoperiod started to increase. Thin lines indicate regressed gonads and sexual rest, while thick lines indicate developing or fully developed gonads. Females are represented by gray lines and males by black lines. For each group, mean dates for the timing of gonadal development and its range in days (in parentheses) are given on the right.

A direct comparison of groups III (transfer to LD16:8 on November 14) and VI (transfer to an intermediate photoperiod LD12:12 on November 9) and the control group C under LD_{nat} is shown in Fig. 4. Transfer to LD12:12 did not stimulate reproductive development. Instead, animals of group VI became reproductive in the middle of March, which is at about the same time as the last two animals from the control group C.

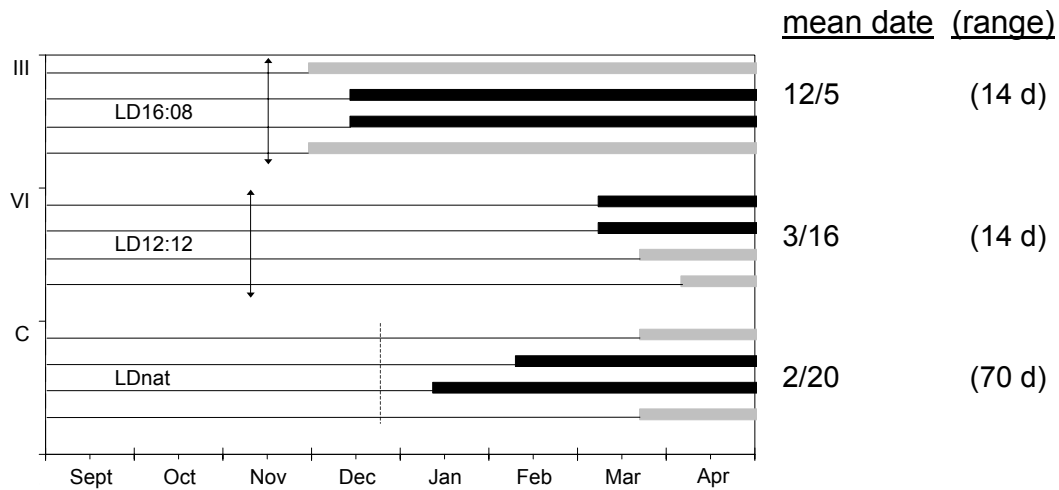


Fig. 4: Effect of transfer to photoperiods of LD16:08 and LD12:12 in winter. Dates of transfer are marked with arrows. Group C was kept under natural conditions until the end of the experiment. The dashed line at group C marks the shortest day in winter 2001/02, i.e., December 22, after which the photoperiod started to increase. For further details see Fig. 3.

A two-way ANOVA revealed a highly significant difference between experimental groups ($F_{5,12} = 49.0$; $p < 0.001$) but no sex difference ($F_{1,12} = 0.09$; ns) in the time until gonadal development, i.e., the number of days between transfer to a long photoperiod and the first appearance of testes or the opening of the vagina. The shortest times (21 ± 4.0 days) were observed in groups III, IV, and V, indicating that gonadal development can be stimulated within 3 weeks. Animals in group II needed approximately twice as long. The longest times (67 ± 10.5 and 129 ± 6.7 days) were observed in groups I and VI, respectively (Fig. 5). Duration of gonadal development of males (22 ± 2.8 days) and females (20 ± 3.4 days) did not differ significantly.

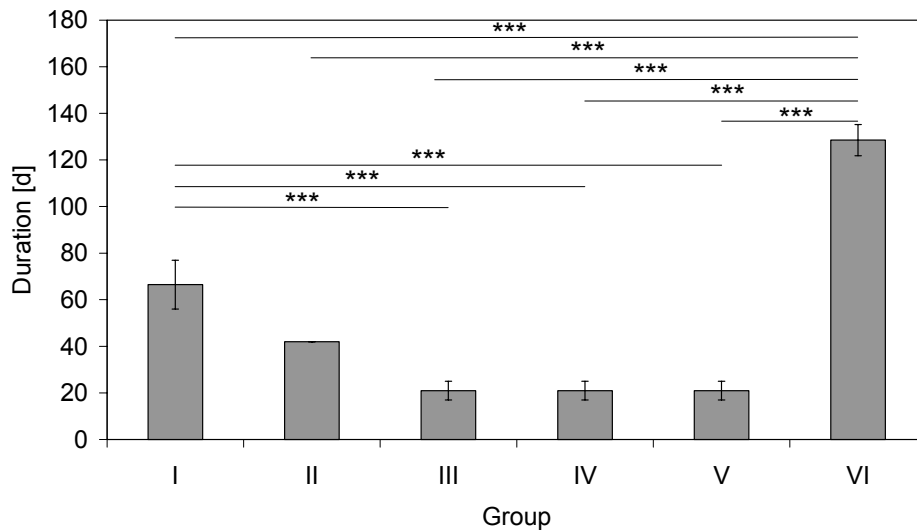


Fig. 5: Statistical analysis of the number of days needed for gonadal development after transfer to a long photoperiod (groups I – V: LD16:8; group VI: LD12:12). Columns represent the mean duration in days \pm SEM. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.01$; Scheffé's multiple t-Test).

Experiment 3: Gonadal development under accelerated and semi-natural photoperiods

There was no difference in the timing of reproductive development between animals kept in LD_{nat} and LD_{semi-nat}. Both groups became reproductive at nearly the same time of the year, namely after 77 ± 5.9 days and 78 ± 6.2 days of increasing photoperiod, i.e., around the middle of March (Fig. 6). Animals kept under an accelerated photoperiod (LD_{shift}) showed a slightly advanced gonadal development after 67 ± 2.6 days (beginning of March), but this effect was not significant ($F_{2,16} = 2.6769$, $p < 0.1$). On the other hand, two-way ANOVA revealed a highly significant sex difference ($F_{1,16} = 8.7746$, $p < 0.001$). Gonadal development occurred earlier in males (68 ± 3.5 days) than in females (81 ± 4.1 days), corresponding to our data from experiment 1. In addition, post-hoc comparisons by the LSD-test revealed that females of the LD_{shift} group were clearly advanced compared to those kept under LD_{nat} and LD_{semi-nat} (Fig. 7). This suggests that females of the LD_{shift} group received a stimulatory long day signal. In contrast, the males in each of the three groups developed their gonads at approximately the same time.

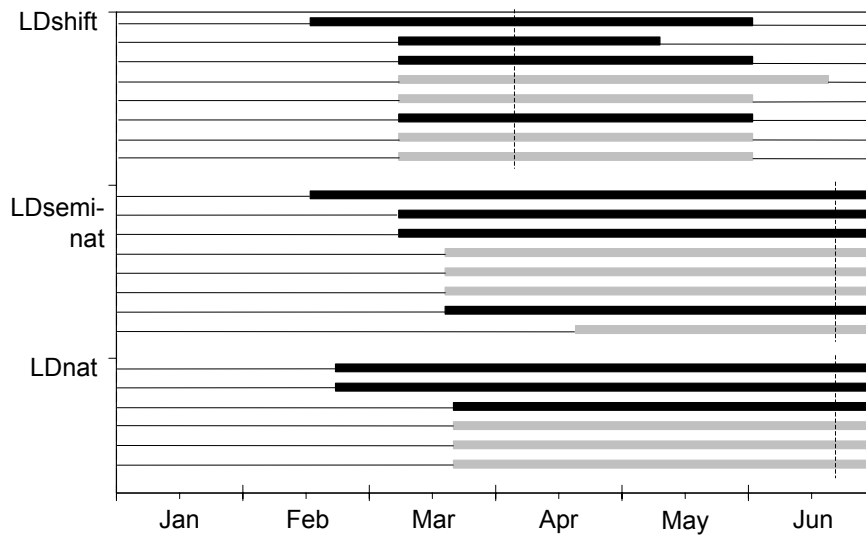


Fig. 6: Reproductive status of three groups of animals kept under different lighting conditions. The LD_{shift} group was exposed to an accelerated photoperiodic lighting regime, i.e., the seasonal photoperiodic cycle of one natural year was compressed into 6 months. The LD_{semi-nat} group was exposed to an artificial lighting regime, mimicking the natural lighting conditions of Stuttgart, while animals of the LD_{nat} group were kept under natural lighting conditions. Dashed lines indicate the longest photoperiod in each group. For further details see Fig. 3.

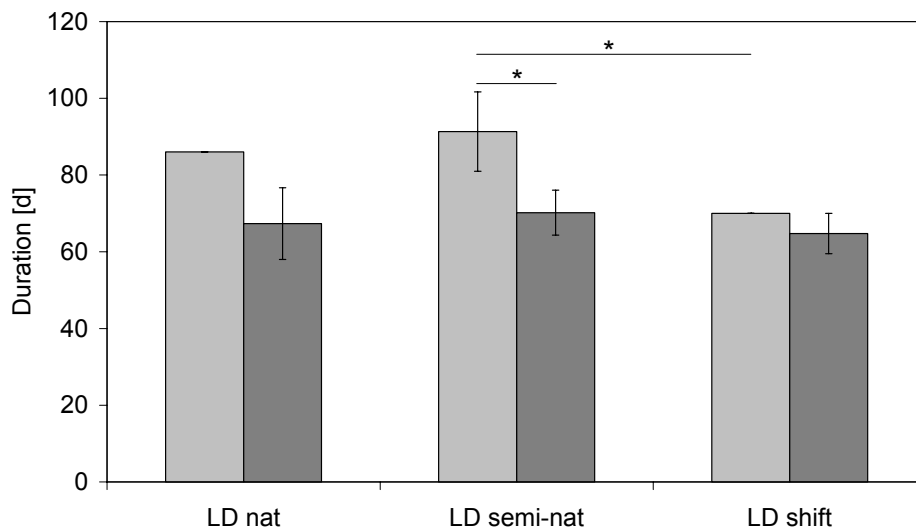


Fig. 7: Comparison of the timing of reproductive activity in male and female European hamsters. Columns represent the mean number of days (\pm SEM) after which the animals were reproductive, starting on December 27, i.e., the first day of increasing lighting regime in the groups with artificial photoperiod. Females are represented by light columns, males by dark columns. Significant differences (LSD-test, $p < 0.05$) are marked by asterisks. Males of all groups differed only slightly from each other. In contrast, females of the LD_{shift} group needed less time (70 ± 0 days) to become reproductive than females kept under LD_{nat} (86 ± 0 days) or LD_{semi-nat} (91 ± 10 days).

DISCUSSION

An important finding of the present study on European hamsters is the transient phase of insensitivity to long photoperiods after short-day induced gonadal regression. Data from groups I to III clearly demonstrate that both males and females did not respond to the long-day signal until mid-November, despite the fact that they had completely regressed gonads by September (Fig. 3). These results reveal an important difference between the European Hamster and other hamster species, in which regrowth of the gonads can be stimulated by exposure to long photoperiods at any stage of gonadal regression [18, 26, 27].

The experiments also demonstrate the existence of a phase of sensitivity to long photoperiods that begins in mid-November. During this phase of sensitivity, transfer to a long photoperiod induced the first signs of gonadal development within 3 weeks. The sensitive phase lasts at least until early January, as observed in group V. Its end, however, cannot be determined more precisely, because of the spontaneous recrudescence of gonads in early spring. Indeed, some animals became reproductive even before the end of January (LD_{nat} less than 9 h of light) without being exposed to a long photoperiod (Figs. 2 and 3). However, data obtained under LD_{nat} also show that quite a few females became reproductive between March 17 and April 20 (Fig. 2). At least for those animals, it seems save to assume that gonadal development was induced by the increasing natural photoperiod 3 weeks earlier. The sensitive phase to long photoperiods may therefore last until the end of March, if it is not terminated earlier by a spontaneous regrowth of the gonads.

Our data also shed some light on the question how long a photoperiod may be necessary to stimulate reproductive activity in spring. The second peak in the number of reproductive females in April (Fig. 2) suggests that these animals received a stimulatory signal 3 weeks earlier, which corresponds to a natural photoperiod of almost 13 h at the end of March (difference between sunrise and sunset at 48.46° N latitude = 12 h 50 min). In addition, all animals of the LD_{shift} group (Fig. 6) showed first signs of gonadal development on March 7 after 70 days of increasing photoperiod, suggesting that gonadal development was induced by the photoperiod perceived 3 weeks earlier, i.e., around February 14, when the experimental photoperiod was 13 h and 10 min. In contrast, transfer to LD12:12 (Fig. 4; group VI) failed to stimulate reproductive activity. Therefore, a photoperiod of approximately 13 h light seems to be both necessary and sufficient to stimulate the reproductive system of the European

hamster. These results demonstrate that in European hamsters, like in Siberian hamsters, the stimulatory or inhibitory effect of a given photoperiod depends on the photoperiodic history of the animals. More than 13 h of light stimulate gonadal development in animals previously exposed to short photoperiods. In contrast, as shown previously, less than 15.5 hours of light induce gonadal regression in animals exposed to a long photoperiod [28].

The history dependent effect of intermediate photoperiods may actually explain the biological significance of the finding that European hamsters show two transient periods of insensitivity during which they do not respond to either long photoperiods (present study) or short photoperiods [23]. In locations such as Stuttgart (48°46' N) or Strasbourg (48°35' N), gonadal regression is induced in the middle of July by photoperiods of less than 15.5 h [28]. Gonadal atrophy is observed 4 weeks later, namely in mid-August [23], when the natural photoperiod has shortened to approximately 14.5 h of light. This is longer than the critical photoperiod for inducing gonadal development. However, the animals are insensitive to the stimulatory long photoperiod until mid-November, when the natural photoperiod has shortened to less than 9 h of light per day. The transient period of insensitivity thus prevents the animals from receiving a photostimulatory signal during fall. The same logic can be applied to the opposite phase of the annual cycle. Under natural conditions, most of the animals are reproductive by the end of April, which corresponds to a natural photoperiod of 14 h. However, the phase of sensitivity to short photoperiods begins only in mid-May [23], when the natural photoperiod is longer than 15 h. Again, the transient phase of insensitivity to short photoperiods prevents the animals from receiving a short-day signal in spring.

An alternative interpretation of the present results could be that European hamsters become refractory to long photoperiods by the end of summer, and that a 1-2 month period of exposure to short days is necessary to break this refractoriness and reinstate the sensitivity to long photoperiods. This interpretation, however, can be ruled out, because it has already been shown that European hamsters kept under long photoperiods for several months will show not only spontaneous regression, but also spontaneous regrowth of their gonads after approximately 3-5 months of gonadal regression [9]. The same has been observed in European hamsters kept under short photoperiods for several months, i.e., the animals show a spontaneous recrudescence of the gonads, followed by a second phase of gonadal regression [9]. Thus European hamsters exhibit both short-day and long-day photorefractoriness. In contrast to other hamster species [29, 30], however, they do not need exposure to an opposite

photoperiod in order to break photorefractoriness. Instead, they avoid the ill-timed perception of stimulatory or inhibitory photoperiods by establishing two periods of insensitivity during which they do not respond to long or short-day signals, respectively.

The European hamster is a true hibernator. For such species, it is a suitable strategy to control gonadal development in spring by an endogenous timer rather than a direct photoperiodic effect, because at that time the animals are still in their hibernating burrows and have no information about photoperiodic changes in the outside world. The biological significance of a sensitive phase to long photoperiod may nevertheless be that of a backup mechanism for those animals, whose endogenous timing mechanisms is delayed. In addition, the sensitive phase may also serve as an entrainment mechanism by which the seasonal rhythm can be synchronized to the natural year. It has already been demonstrated for a number of species with true circannual rhythms that these circannual rhythms can be entrained or synchronized by exposing the animals to photoperiodic information only once or twice a year [10]. For example, providing photoperiodic information by means of a circadian melatonin pattern for as little as 70 days each year can maintain entrainment of the reproductive cycle in sheep [21, 22].

Data from both Masson-Pévet et al. [9] and our lab indeed suggest that transfer to a long photoperiod will not only induce gonadal development, but also phase advance the whole reproductive cycle. In European hamsters exposed to long photoperiods by mid-October, not only gonadal regrowth, but also the subsequent gonadal regression and recrudescence were advanced by 2 to 3 months compared to control animals (Fig. 12 in [9]). In our study, most of the LD_{shift} animals started gonadal regression almost simultaneously at the end of May (Fig. 6), which was most likely caused by the gradual decrease in photoperiod, effective in this group as of April 4. Previous studies by Saboureau et al. [23] have demonstrated that it takes 4 weeks after a short-day signal to start gonadal regression, and that the perception of a short-day signal requires a phase of sensitivity for photoperiodic information. Therefore, the animals must have been sensitive at the end of April, i.e., 2 weeks before sensitivity to short photoperiods occurs under natural conditions [23]. This suggests that the phase of sensitivity to short photoperiods was also advanced in the LD_{shift} group.

The results of the present study can well be incorporated into a working model of the photoperiodic regulation of seasonal reproductive cycles in the European hamster. According

to the present state of knowledge, illustrated in Fig. 8, an endogenous circannual rhythm (\sim) provides the primary drive for both the transition from gonadal quiescence during hibernation to reproductive activity during the mating season, and the transition from reproductive activity back to gonadal quiescence. The ambient photoperiod synchronizes this circannual rhythm by means of two phases of sensitivity. One phase of sensitivity to short photoperiod starts in mid-May and lasts approximately until end of July [23]. During this phase exposure to a photoperiod of less than 15.5 - 15.0 h of light (critical photoperiod according to [28]) will induce gonadal atrophy within 4 weeks (-). Without exposure to a short photoperiod, nevertheless most of the animals show gonadal regression, although a few weeks later than under natural conditions [9]. The short photoperiod thus serves to synchronize the endogenous circannual rhythm.

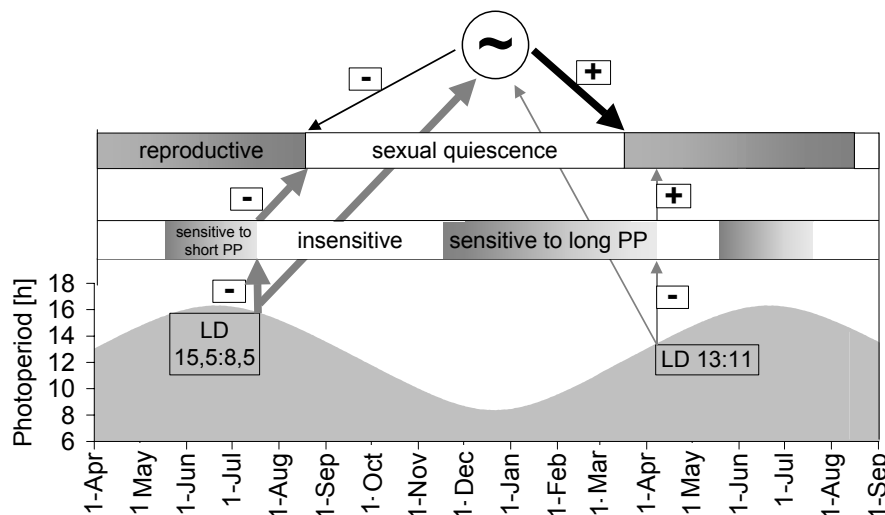


Fig. 8: Model for the regulation of the seasonal reproductive cycle of European hamsters. An endogenous circannual rhythm (\sim) provides the primary drive for both the transition from gonadal quiescence during hibernation to reproductive activity, and the transition from reproductive activity back to gonadal quiescence. The ambient photoperiod synchronizes this circannual rhythm by means of two phases of sensitivity. Differences in the thickness of the arrows indicate differences in the importance of endogenous or photoperiodic mechanisms for the timing of the seasonal reproductive cycle. For further details see text.

A complementary phase of sensitivity to long photoperiods starts in mid-November and extends until March or early April. Exposure to a photoperiod longer than 13 h of light (critical photoperiod as determined in the present study) will induce gonadal development within 2-4 weeks (+). However, most of the animals will undergo gonadal development even without exposure to a long photoperiod because they become refractory to the short

photoperiods in early spring. The transition to a long photoperiod in spring is thus not as important for controlling the seasonal reproduction rhythm as the complementary transition from long to short photoperiods in summer. Our results further suggest that male European hamsters depend more on the endogenous timing mechanism for triggering gonadal development, while female hamsters depend more on the stimulatory effect of a long photoperiod.

In summary, the demonstration of an annual phase of sensitivity to long days provides further proof for a hypothesis proposed by Masson-Pevet et al. [9], that in European hamsters annual rhythms of body weight and reproduction are controlled by an endogenous circannual system entrained to the natural year by photoperiodic information.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Harald Feuchter for expert animal care and two anonymous referees for their valuable comments on a previous version of this manuscript.

REFERENCES

1. Canguilhem B, Marx C. Regulation of the body weight of the European hamster during the annual cycle. *Eur J Physiol* 1973; 338: 169-175.
2. Canguilhem B, Masson-Pévet M, Koehl C, Pévet P, Bentz I. Non-gonadal mediated effect of photoperiod on hibernation and body weight cycles of the European hamster. *Comp Biochem Physiol [A]* 1988; 89A: 575-578.
3. Canguilhem B. External and endogenous control of body weight rhythm in the European hamster, *Cricetus cricetus*. In: Malan A, Canguilhem B (eds.), *Living in the Cold*. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd.; 1989: 25-32.
4. Buijs RM, Pévet P, Masson-Pévet M, Pool CW, deVries GJ, Canguilhem B, Vivien-Roels B. Seasonal variation in vasopressin innervation in the brain of the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Brain Res* 1986; 371: 193-196.
5. Pévet P, Vivien-Roels B, Masson-Pévet M, Steinlechner S, Skene D, Canguilhem B. Melatonin, serotonin, 5-hydroxyindole-3-acetic acid and N-acetyltransferase in the pineal of the european hamster (*Cricetus cricetus*) kept under natural environmental conditions: Lack of a day/night rhythm in melatonin formation in spring and early summer. *J Pineal Res* 1989; 6: 233-242.
6. Skene DJ, Masson-Pévet M, Pévet P. Seasonal changes in melatonin binding sites in the pars tuberalis of male European hamsters and the effect of testosterone manipulation. *Endocrinology* 1993; 132: 1682-1686.
7. Wollnik F, Breit A, Reinke D. Seasonal change in the temporal organization of wheel-running activity in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Naturwissenschaften* 1991; 78: 419-422.
8. Wollnik F, Schmidt B. Seasonal and daily rhythms of body temperature in the European hamster (*Cricetus cricetus*) under semi-natural conditions. *J Comp Physiol [B]* 1995; 165: 171-182.
9. Masson-Pévet M, Naimi F, Canguilhem B, Saboureau M, Bonn D, Pévet P. Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (*Cricetus cricetus*) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J Pineal Res* 1994; 17: 151-163.
10. Zucker I. Circannual Rhythms: Mammals. In: Takahashi JS, Turek FW, Moore RY (eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology (Vol. 12): Circadian Clocks*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2001: 509-528.
11. Pengelley ET, Asmundson SJ. Circannual rhythmicity in hibernating mammals. In: Pengelley ET (ed.), *Circannual Clocks*. New York: Academic Press; 1974: 95-160.
12. Lee TM, Zucker I. Suprachiasmatic nucleus and photic entrainment of circannual rhythms in ground squirrels. *J Biol Rhythms* 1991; 6: 315-330.

13. Hiebert SM, Thomas EM, Lee TM, Pelz KM, Yellon SM, Zucker L. Photic entrainment of circannual rhythms in golden-mantled ground squirrels: Role of the pineal gland. *J Biol Rhythms* 2000; 15: 126-134.
14. Concannon PW, Parks JE, Roberts PJ, Tennant BC. Persistent free-running circannual reproductive cycles during prolonged exposure to a constant 12L:12D photoperiod in laboratory woodchucks (*Marmota monax*). *Lab Anim Sci USA* 1992; 42: 382-391.
15. Concannon P, Roberts P, Baldwin B, Erb H, Tennant B. Alteration of growth, advancement of puberty, and season-appropriate circannual breeding during 28 months of photoperiod reversal in woodchucks (*Marmota monax*). *Biol Reprod* 1993; 48: 1057-1070.
16. Karsch FJ, Robinson JE, Woodfill CJI, Brown MB. Circannual cycles of luteinizing Hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol Reprod* 1989; 41: 1034-1046.
17. Hoffmann K. Photoperiod, pineal, melatonin and reproduction in hamsters. *Prog Brain Res* 1979; 52: 397-415.
18. Stetson MH, Watson-Whitmyre M. Physiology of the pineal and its hormone melatonin in annual reproduction in rodents. In: Reiter RJ (ed.), *The Pineal Gland*. New York: Raven Press; 1984: 109-153.
19. Goldman BD. Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 2001; 16: 283-301.
20. Gorman MR, Goldman BD, Zucker I. Mammalian Photoperiodism. In: Takahashi JS, Turek FW, Moore RY (eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology (Vol. 12): Circadian Clocks*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2001: 481-508.
21. Matthews CD, Guerin MV, Deed JR. Melatonin and photoperiodic time measurement: Seasonal breeding in the sheep. *J Pineal Res* 1993; 14: 105-116.
22. Woodfill CJI, Wayne NL, Moenter SM, Karsch FJ. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: Identification of season-specific time cues. *Biol Reprod* 1994; 50: 965-976.
23. Saboureau M, Masson-Pévet M, Canguilhem B, Pévet P. Circannual reproductive rhythm in the European hamster (*Cricetus cricetus*): Demonstration of the existence of an annual phase of sensitivity to short photoperiod. *J Pineal Res* 1999; 26: 9-16.
24. Watson-Whitmyre M, Stetson MH. A mathematical method for estimating paired testes weight from in situ testicular measurements in three species of hamsters. *Anat Rec* 1985; 213: 473-476.
25. Lerchl A, Schlatt S. Influence of photoperiod on pineal melatonin synthesis, fur color, body weight, and reproductive function in the female Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 1993; 57: 359-364.

26. Hoffmann K. The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight, and pelage colour in the Djungarian Hamster (*Phodopus sungorus*). J Comp Physiol 1973; 85: 267-282.
27. Hoffmann K. Photoperiodic mechanisms in hamsters: the participation of the pineal gland. In: Assenmacher I, Farner DS (eds.), Environmental Endocrinology. Berlin: Springer; 1978: 94-102.
28. Canguilhem B, Vaultier JP, Pévet P, Coumaros G, Masson-Pévet M, Bentz I. Photoperiodic regulation of body mass, food intake, hibernation, and reproduction in intact and castrated male European hamster, *Cricetus cricetus*. J Comp Physiol [A] 1988; 163: 549-557.
29. Reiter RJ. Pineal function in long term blinded male and female golden hamsters. Gen Comp Endocrinol 1969; 12: 460-468.
30. Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Matt KS. Termination of photorefractoriness in golden hamsters - photoperiodic requirements. J Exp Zool 1977; 202: 81-88.

The two physiological Identities of the European Hamster (*Cricetus cricetus* L.) – A Race against the Time of Year.

Die zwei physiologischen Identitäten des Feldhamsters (*Cricetus cricetus*) – ein Wettlauf gegen das Jahr

STEFANIE MONECKE

Kurzfassung: In Anpassung an die Jahreszeiten zeigt der Europäische Feldhamster ausgeprägte saisonale Veränderungen in seiner Physiologie und im Verhalten. So wechseln sich Reproduktionszeit mit Winterschlaf und Zunahme mit Abnahme des Körpergewichtes im Jahresverlauf ab; Aktivitätsmuster und Melatoninproduktion variieren ebenfalls über das Jahr. Diese saisonalen Veränderungen haben eine starke endogene Komponente. Eine Besonderheit beim Feldhamster ist, daß das ausschließlich nachts produzierte Hormon Melatonin in der Zeit um den längsten Tag (kürzeste Nacht) nicht produziert wird (Vivien-Roels et al. 1992). In unserer Studie suchten wir nach möglichen Korrelationen zwischen den oben beschriebenen Parametern. Eine vorläufige Auswertung der Daten zeigt eine Korrelation zwischen der auffälligen Phase in der Melatonin Produktion, einer Phase im Aktivitätsmuster, welche sich durch einen äußerst exakten 24 h Rhythmus auszeichnet, und einer von Saboureau et al. (1999) postulierten sensitiven Phase für Kurztag-Information zwischen dem 15. Mai und dem 15. Juli. Vier Wochen später begann die Gonadenregression. Dieses Kurztag- Signal ist für die Tiere von höchster Bedeutung, denn zum einen zeigt es den bevorstehenden Winter an und ermöglicht dem Feldhamster eine rechtzeitige Vorbereitung des Winterschlafs und zum anderen stellt es vermutlich die endogene Jahresuhr, welche für das korrekte „timing“ der Gonaden- Regeneration im Frühjahr und der sensitiven Phase im nächsten Sommer verantwortlich ist. In dieser sensitiven Phase vom 15. Mai bis 15. Juli könnte jede Störung der Tiere durch künstliches Licht oder Einfangen und Umsiedeln dazu führen, daß die Tiere dieses lebensnotwendige Signal verpassen.

The natural habitat of the European hamster is characterized by dramatic changes in day length (photoperiod) resulting in pronounced modifications in climate and vegetation over the year. In adaptation to these important environmental conditions the European hamster exhibits pronounced seasonal variations in its physiology and behavior.

For the European hamster, the year starts in a hibernating state deep under the earth without any information about the time of day and the time of year. Nevertheless, at a certain time in early spring the reproductive system, which was degenerated during wintertime, shows a spontaneous regeneration. When it is completely developed, the European hamsters leave their burrows and search for a mating partner. It is remarkable that all these solitarily living animals leave their burrows almost simultaneously around the beginning of March without having any information about the time of year, suggesting that they have some sort of an internal clock controlling this process. Spring and summer time are characterized by reproduction and breeding. However, when the days become shorter in late summer the gonads start to regress again and the animals hoard food for the coming winter. In autumn the animals vanish into their burrows in order to hibernate again until the following spring (Pévet et al. 1989).

The body weight follows an annual cycle, too. In spring and summer the body weight increases strongly, whereas it decreases slightly in autumn and winter. This is not a reaction to the poor availability of food in winter. Instead, it has been shown that there is a regulating mechanism, which undergoes circannual variations (Canguilhem and Marx 1973). The decrease of body weight in the second half of the year serves the purpose to save energy during hibernation, because a smaller body has a smaller surface and thus a minor heat loss.

In addition to the seasonal cycles of the reproductive state and body weight, the temporal organization of the activity changes in a seasonal manner (Wollnik et al. 1991). The European hamster is mainly nocturnal and shows high amounts of activity per 24 hours only during a few months in the middle of summer. In autumn the rhythmicity vanishes slowly, the activity level decreases, and the animals become completely arrhythmic during the winter.

According to the present state of knowledge, the hormone melatonin is strongly involved in seasonal changes of behavior and physiology (Pévet 2000; Reiter 1988). The hormone melatonin is produced by the pineal gland only at night and released into the blood circuit.

Therefore, every cell of the body receives information about at least two times a day, namely day (if there is no melatonin) and night (if there is a certain level of melatonin). Depending on the night length the duration and amplitude of the melatonin signal varies. As a result melatonin also indicates the time of year. In the long winter nights there is a long, pronounced peak of melatonin release, which gets shorter and weaker when days become longer. It is unique for the European hamster that around the longest day (shortest night) on June 21st, there is no nightly melatonin elevation at all, neither in the pineal gland nor in the blood (Vivien-Roels et al. 1992; Vivien-Roels et al. 1998; Vivien-Roels et al. 1997).

Saboureau et al (1999) have demonstrated that European hamsters have a sensitive phase for short days, which starts approximately on May 15th and ends around July 15th. Prior to that phase the animals are not able to interpret the current photoperiod. If the animals notice during that sensitive time that the day length becomes shorter, they react with a regression of their gonads and prepare for hibernation. It takes approximately 4 weeks from the perception of the short-day signal until the first visible reduction of the gonads takes place. The timing of this sensitive phase is most likely endogenous. The end is determined by the day when the animals recognize a reduced day length, which happens around July 15th under natural conditions. In Strasbourg where the investigation took place day length shortens only about 1 min/d during the time between June 21st and July 15th. That means that first the animals are extremely sensitive for the short-day signal and that second it is very important for them to receive the signal on time. Otherwise they may be late with their hibernation cycle, which could mean they do not survive.

In summary, it can be said that European Hamsters show pronounced changes in their physiology and behavior, which have a strong endogenous component. The aim of the present investigation was to look for a possible correlation between the parameters discussed above. For that reason, the wheel running activity of 8 European hamsters (3 male, 5 female) was registered over one year under natural lighting conditions, but constant temperature (20 ± 1 °C) and humidity ($55 \pm 5\%$). Body weight and reproductive status were controlled every three weeks. Additionally, the animals' urine was collected at every "full" photoperiod (e.g. 10 h of light, 11 h of light, 12 h of light etc.) in 2 h intervals over 24 h in order to determine its content of 6-sulfatoxymelatonin (aMT6s) in each fraction. aMT6s is the main catabolism product of melatonin which is excreted with the urine.

A preliminary analysis of the data revealed the following results: As has been demonstrated for melatonin levels in the blood or in the pineal gland (Vivien-Roels et al. 1992; Vivien-Roels et al. 1998; Vivien-Roels et al. 1997), the present study revealed a distinct day-night difference in aMT6s excretion during fall, winter and spring. In contrast, no nightly elevation of aMT6s was observed in the middle of summer. The phase of low or absent aMT6s excretion starts somewhere in the middle of May with an obvious inter-individual variability between animals. In contrast, the phase ends more or less consistently in the middle of July. The activity patterns of all animal showed one striking characteristic: There was a phase in the middle of summer, when the pattern had a very precise 24 h rhythm, i.e., the animals began to run at the same time each day in the early evening, no matter if it was already dark or still daylight, since sunset shifted from day to day. Similar to the phase of absent aMT6s, the striking phase in the activity pattern started also somewhere between April and the beginning of June, but it ended quite simultaneously in all animals in the middle of July. Saboureau et al. (1999) found that the sensitive phase for short days ends as well in the middle of July with the reception of the short day signal. The start of the gonad regression occurs 4 weeks later. The present data also show that approximately 4 weeks after the reappearance of the nightly melatonin signal and the disappearance of the precise 24 h activity pattern described above, the gonads of the animals started to regress. Concurrently the body weight decreased. Therefore, it seems that the peculiar phase in the middle of summer, which is characterized by an absent melatonin excretion on one hand and a rather precise activity pattern on the other hand, correlates with the sensitive phase for short day information which has been postulated by Saboureau et al. (1999).

Since the daily profile of melatonin production and the activity pattern are both output parameters of the endogenous circadian clock, the present data indicate that something is altered in the circadian clock during the sensitive phase in the middle of summer. This change in the circadian system may cause the increased sensitivity for short days. Furthermore, our data raise the hypothesis that either the reappearance of a daily melatonin peak or the change in the activity pattern may provide the necessary “winter signal”. Alternatively, it may be possible that they simply coincided with an undiscovered hormonal or neuronal signal. Further investigations are necessary to prove these hypotheses.

Whatever mechanism may be responsible for the increased short-day sensitivity, it seems to be connected with the circadian clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) in the

hypothalamus (Klein et al. 1991). Changes in daylength are perceived by the circadian system within the SCN and are most likely transferred from the SCN to the circannual clock, the location of which is still unknown. At the present time, the nature of this signal (humoral or neural) is still a mystery. Nevertheless, there is no doubt, that the signal is very important for the resetting of the circannual clock, which times the regeneration of the gonads in spring and the new sensitive phase in the summer of the following year.

Since it can not be excluded that the daily melatonin or activity patterns are responsible for the necessary sensitivity for short days in summer, it is advisable to not disturb the animals' sensitivity by artificial light or by capture. The influence of artificial light during the night should be avoided, because it may interfere with the release of melatonin from the pineal. Capture and resettlement of the animal may lead to stress and thus to higher activity at the wrong time. This may affect the activity pattern for several days and may disturb the sensitivity for short days. As a consequence, the European hamster may miss the important "winter- and reset-signal", and its annual rhythm of physiology may be disturbed for an entire year.

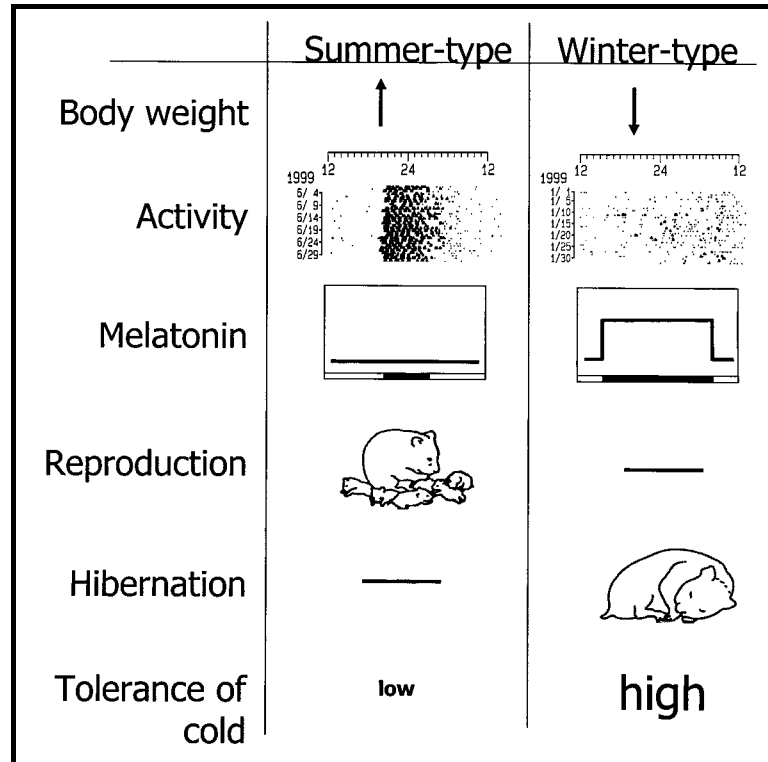


Figure 1: The two physiological identities of the common hamster
Abbildung 1: Die zwei physiologischen Identitäten des Feldhamsters

LITERATURE:

- Canguilhem, B., and Marx, C. (1973). "Regulation of the body weight of the European hamster during the annual cycle." *Pflügers Archiv*, 169-175.
- Klein, D. C., Moore, R. Y., and Reppert, S. M. (1991). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's clock*, Oxford University Press, Oxford.
- Pévet, P. (2000). "Melatonin and biological rhythms." *Biological Signals and Receptors*, 9(3-4), 203-212.
- Pévet, P., Masson-Pévet, M., Hermès, M. L. H. J., Buijs, R. M., and Canguilhem, B. (1989). "Photoperiod, pineal gland, vasopressinergic innervation and timing of hibernation." *Living in the Cold*, A. Malan and B. Canguilhem, eds., Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd., 43-51.
- Reiter, R. (1988). "Comparative aspects of pineal melatonin rhythms in mammals." *ISI Atlas of Science, Plants & Animals*, 111-116.
- Saboureau, M., Masson-Pévet, M., Canguilhem, B., and Pévet, P. (1999). "Circannual reproductive rhythm in the European hamster (*Cricetus cricetus*): Demonstration of the existence of an annual phase of sensitivity to short photoperiod." *Journal of Pineal Research*, 26(1), 9-16.
- Vivien-Roels, B., Pévet, P., Masson-Pévet, M., and Canguilhem, B. (1992). "Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the European hamster." *General and Comparative Endocrinology*, 86, 239-247.
- Vivien-Roels, B., Pitrosky, B., Zitouni, M., Malan, A., Canguilhem, B., Bonn, D., and Pevét, P. (1998). "Photoperiodic control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 839(1), 386-388.
- Vivien-Roels, B., Pitrosky, B., Zitouni, M., Malan, A., Canguilhem, B., Bonn, D., and Pévet, P. (1997). "Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*." *General and Comparative Endocrinology*, 106(1), 85-94.
- Wollnik, F., Breit, A., and Reinke, D. (1991). "Seasonal change in the temporal organization of wheel-running activity in the European hamster, *Cricetus cricetus*." *Naturwissenschaften*, 78, 419-422.

Sponsored by DFG (Wo 354/12-1)

STEFANIE MONECKE
Biological Institute, Department of Animal Physiology
University of Stuttgart
Pfaffenwaldring 57
70550 Stuttgart
E-mail: stefanie.monecke@po.uni-stuttgart.de

**Seasonal variations in circadian rhythms
characterize a phase of sensitivity to short
photoperiods in the European hamster,
*Cricetus cricetus***

STEFANIE MONECKE & FRANZISKA WOLLNIK

*Biological Institute, Department of Animal Physiology, University
of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Germany*

Address for correspondence:

Franziska Wollnik

Biological Institute

Dept. of Animal Physiology

University of Stuttgart

Pfaffenwaldring 57

70550 Stuttgart, Germany

Franziska.Wollnik@po.uni-stuttgart.de

Phone: ++49-711-685-5001

Fax: ++49-711-685-5090

ABSTRACT

European hamsters (*Cricetus cricetus*) show pronounced seasonal changes in their physiology and behavior. The present study provides the first detailed analysis of the temporal relationship between seasonal cycles of reproduction and body weight and seasonal changes of two circadian parameters, i.e., locomotor activity and 6-sulphatoxymelatonin (aMT6s) excretion, in individual animals kept under natural light conditions. Our results demonstrate a characteristic pattern of locomotor activity and aMT6s excretion observed around the summer solstice, i.e., from mid-May to mid-July. Locomotor activity was characterized by a high level of activity and an early onset of activity. Seasonal changes in aMT6s and the pattern of locomotor activity were only loosely related to changes in the reproductive status of the animals. Instead, they correlated well with a period of the annual cycle during which the animals are sensitive to short days and may thus reflect a specific state of the circadian pacemaker system within the SCN. The present finding of a behavioral and physiological marker for the annual phase of sensitivity to short photoperiods should thus be a valuable tool to further characterize molecular and physiological mechanisms of photoperiodic time measurements in European hamsters.

KEYWORDS

Seasonal rhythms • Natural photoperiod • Entrainment • Body weight • Reproduction • Melatonin • Activity

ABBREVIATIONS

aMT6s 6-sulphatoxymelatonin, α alpha (activity duration), ψ_{on} phase angle of activity onset, ψ_{off} phase angle of activity offset

INTRODUCTION

European hamsters (*Cricetus cricetus*), like many other hibernating species, display robust annual rhythms in body weight (Canguilhem et al. 1988a; Canguilhem 1989) and reproduction (Buijs et al. 1986; Masson-Pévet et al. 1994). In central Europe under natural conditions, European hamsters breed from April to August (Sulzer 1774; Petzsch 1936; Krsmanovic et al. 1984; Nechay 2000). At the end of July gonadal regression is initiated by the decrease in day length to less than 15.5 – 15.0 hours of light (Canguilhem et al. 1988b; Saboureau et al. 1999). Gonadal regression and accessory organ atrophy are completed within 8 weeks (Masson-Pévet et al. 1987), and hibernation starts in October/November (Ruzic 1976; Wollnik et al. 1995). The animals remain sexually quiescent until February/March, when they show a spontaneous regrowth of their gonads at the end of the hibernation period (Buijs et al. 1986).

Annual rhythms of reproduction and body weight persist for at least 2 cycles in a large number of animals kept under constant photoperiods (Canguilhem 1989) as well as in pinealectomized animals (Masson-Pévet et al. 1994), thus providing evidence for an endogenous circannual rhythm. The ambient photoperiod synchronizes these circannual rhythms by means of two phases of sensitivity. One phase of sensitivity to short photoperiods has been demonstrated around the summer solstice, i.e., from mid-May and to mid-July (Saboureau et al. 1999). During this phase exposure to a short photoperiod (LD10:14) induces gonadal atrophy within 4 weeks. A complementary phase of sensitivity to long days occurs around the winter solstice, i.e., from mid-November to March or early April (Monecke et al. 2003 in submission). During that phase exposure to a long photoperiod (LD16:8) induces the first signs of gonadal development within 3 weeks.

In common with other seasonally breeding mammals, European hamsters measure changes in photoperiod by a neuroendocrine pathway that conveys photic information into a circadian rhythm of melatonin production in the pineal gland (Reiter 1993; Goldman 2001; Pévet 2003): Photoperiodic information received by the eye passes via the retinohypothalamic tract to the suprachiasmatic nucleus (SCN), and eventually via the medial forebrain bundle to the superior cervical ganglia, and then by a sympathetic pathway to the pineal gland. Because melatonin is only synthesized and secreted during the night, it provides the organism with a hormonal code of night length and thus serves as both a daily and a seasonal message

(Bartness et al. 1989). Seasonal changes in the nocturnal melatonin secretion have been reported for a variety of species, especially when raised outdoors (Rollag et al. 1978; Brainard et al. 1982; Vivien-Roels et al. 1992; Steinlechner et al. 1995; Vivien-Roels et al. 1997). European hamsters show exceptionally strong variations in the duration and amplitude of the nocturnal melatonin peak, ranging from a 10- to 20-fold nightly melatonin elevation during short photoperiods to an almost complete lack of a melatonin rhythm during photoperiods of LD16:08 and longer (Vivien-Roels et al. 1992; Vivien-Roels et al. 1997). Recently it has been demonstrated that these seasonal variations are mainly driven by arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene transcription and enzyme activity (Garidou et al. 2003).

Seasonal changes in day length also affect other circadian functions as has been demonstrated for the daily activity pattern in various mammals and birds (Daan et al. 1975). European hamsters display a well-defined activity rhythm with a high level of activity only around the summer solstice and are almost arrhythmic during the remaining part of the year (Wollnik et al. 1991). These seasonal changes in locomotor activity seem to run in parallel with changes in melatonin secretion, i.e., activity levels are high when the nocturnal melatonin peak is rather low, and vice versa. The rhythms of pineal melatonin production and locomotor activity are both controlled by the circadian pacemaking system in the SCN. Parallel changes in both output parameters would suggest that the SCN itself is affected by the photoperiod. It has already been demonstrated in the European hamster that photoperiod affects the light-induced stimulation of c-Fos protein in the SCN (Vuillez et al. 1996), an *in vivo* marker of the photic sensitivity of the circadian system, as well as the expression of so-called clock genes. This raises the question, whether the peculiar pattern of melatonin secretion and locomotor activity reflects a specific state of the circadian pacemaker system. Unfortunately, previous studies on seasonal changes in melatonin secretion and locomotor activity of European hamsters were done in different animals and in different labs. One objective of the present study was thus to examine, on a seasonal basis, the temporal relationship between locomotor activity and melatonin rhythms in individual animals kept under natural lighting conditions. In order to obtain long-term measurements of melatonin secretion from individual animals we choose a non-invasive method by analyzing the excretion of the main urinary metabolite, 6-sulphatoxymelatonin (aMT6s) (Nowak et al. 1987; Brown et al. 1991; Stieglitz et al. 1995; Klante et al. 1999)

The second aim of the present study was to relate seasonal changes in melatonin secretion and locomotor activity to changes in the general physiology of the animals during the reproduction or the hibernation period. It is well known, that sex steroid affect both the phase angle of entrainment and the amplitude of circadian activity rhythms (Zucker 1979; Turek et al. 1982; McEachron et al. 1993). This raises the possibility that seasonal changes in melatonin and locomotor activity rhythms are a direct result of changes in the gonadal status of the animals. Therefore, seasonal changes in body weight and reproductive status were also monitored throughout a year in animals kept under natural lighting conditions.

MATERIAL AND METHODS

Animals

European hamsters (3 males and 5 females) were born in our breeding colony on July 26, 2000 under natural light conditions (LD_{nat}) at Stuttgart (latitude 48°46' N), but constant temperature ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$). After weaning, the animals were maintained under the same environmental conditions and were housed individually in Macrolon cages (type IV, Becker, Castrop Rauxel, Germany) equipped with a nest box and a running wheel (diameter 35 cm, width 10 cm). Food (Altromin 1314, Lage) and tap water were given *ad libitum*. The studies were performed in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the German law.

Experimental design

Starting with the shortest day of the year 2000, namely December 20, four physiological parameters were monitored over a period of 12 month, namely the annual rhythms of reproduction and body weight and the daily rhythms of locomotor activity and urinary aMT6s excretion. Body weight and reproductive status was checked every 3 weeks during the cage-cleaning procedure. For aMT6s excretion, urine samples (see below) were taken at every full photoperiod (LD09:15, LD10:14, LD11:13 etc., Fig. 1) of the LD_{nat} regime in order to allow direct comparisons with previous data on the European hamster originating from experiments under constant artificial photoperiods. In addition, urine samples were taken on the shortest (LD_{min} = 08 h 15 min light) and the longest day (LD_{max} = 16 h 11 min light) of the natural year and for a natural day length of 15.5 h of light (critical photoperiod to induce gonadal regression (Canguilhem et al. 1988b)). Increasing and decreasing photoperiods are specified by the indices “i” and “d”, e.g., LD12:12_i stands for the vernal and LD12:12_d for the autumnal equinox. The number of days from one photoperiod to the next varied slightly, since changes in photoperiod occur at a higher rate around the equinoxes than around the summer or winter solstices. Sunrise and sunset times were derived from the local meteorological office (Deutscher Wetterdienst Stuttgart) and all clock times were adjusted for periods of daylight saving.

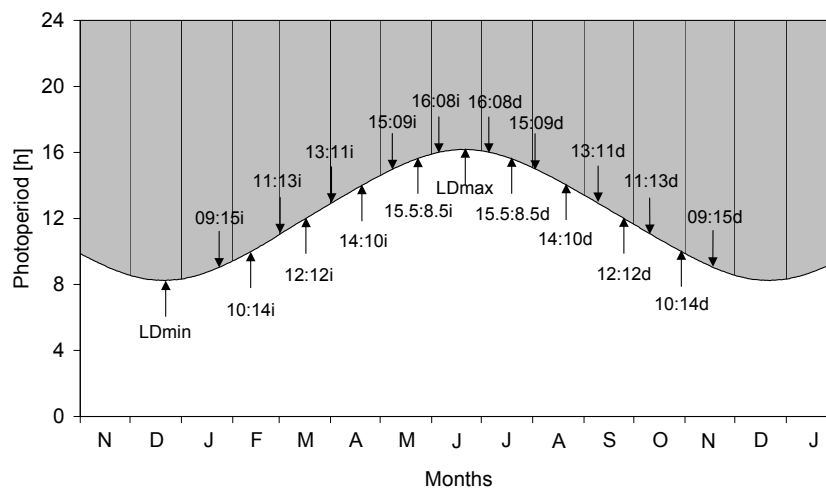


Fig. 1: Schematic representation of the seasonal changes in photoperiod (hours between sunrise and sunset) at Stuttgart latitude ($48^{\circ}46'$ N). 24-h samples of urinary aMT6s excretion were obtained at the indicated photoperiods. The indices “i” and “d” stand for increasing and decreasing photoperiod.

Reproductive status and body weight

The reproductive status of the animals was checked under a light anesthesia with enflurane vapor (Ethrane ®, Abbot). Four stages of the reproductive cycle were distinguished: (1) sexual quiescence with completely regressed gonads, (2) gonadal development, i.e., the transition into the reproductive phase, (3) reproductive phase with fully developed gonads, and (4) gonadal regression, i.e., the transition into sexual quiescence. In males, sexual quiescence was terminated by the descent of the testes into the scrotum. After the descent, testis size was measured with a caliper-square, which is a standard procedure to determine the reproductive status of male hamsters (Watson-Whitmyre et al. 1985). It has already been shown in European hamsters, that testis length measured by external palpation accurately reflects real testis length following laparotomy (Masson-Pévet et al. 1994). In addition, testis length correlates well with testis weight (Masson-Pévet et al. 1994) and with plasma testosterone levels (Buijs et al. 1986). Based on these collective correlations, testes were considered fully developed with a length ≥ 1.8 cm. At this size, levels of testosterone are maximal and the animals are reproductive. In fall, the beginning of gonadal regression was defined by a testis length ≤ 1.8 cm. Gonadal regression was completed with the re-ascent of the testes into the abdominal cavity. In females, the vagina is completely closed during sexual quiescence. The beginning of gonadal development was thus defined by the first opening of

the vagina. Females were considered to be reproductive, when the vagina was completely open and appeared moist. It has already been demonstrated for Djungarian hamsters that there is a good correlation between ovarian cyclicity and the opening of the vagina (Lerchl et al. 1993). In addition, studies in our own lab revealed that reproductive female European hamsters show regular estrous cycles with a cycle length of 4-5 days. In most animals, ovarian cyclicity started immediately after the complete opening of the vagina and ended 1-2 weeks before its closure (unpublished results). Thus it seemed safe to assume that the opening of the vagina is a sufficiently good indicator for the reproductive period. Body weights were taken at two occasions: (1) every 3 weeks during cage cleaning and (2) at the photoperiodic intervals, i.e., before transfer to the metabolic cages. These data were then pooled for the analysis of annual body weight rhythms. However, data obtained during the first week after a urine collection were excluded because some of the animals showed a transient weight loss immediately after housing in the metabolic cage.

Urine sampling and aMT6s assay

Seasonal changes in the 24 h melatonin rhythm were determined on an individual basis by analyzing the urinary excretion of aMT6s, the main catabolite of melatonin. For urine collections, the animals were transferred into metabolic cages (diameter 20 cm) and provided with slices of apple and a mixture of 1/3 apple juice and 2/3 water in order to increase urinary excretion. To minimize a possible impact on the activity pattern after urine sampling, animals were transferred to the metabolic cages around noon and were released into their home cage 1 hour before sunset. The metabolic cages were equipped with a special funnel system, which separated urine from feces. In an automated setup, the funnel and connecting tubes (silicone, inner diameter 1 mm) were washed every 2 h with 1 ml distilled water. Urine samples including water were transported by a peristaltic pump and collected automatically in fractions of 2 h. Urine samples were centrifuged at 2500 g for 10 min to remove solid material and contaminations and stored at -70°C for later analysis. For more details see (Klante et al. 1997).

The content of aMT6s was determined in duplicate using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (aMT6s ELISA, IBL, Hamburg) in urine samples taken from 20:00 h to 12:00 h, when the nightly peak in aMT6s excretion was expected. Intraassay coefficients of variation were 9.6 % and 12.3 % for standards containing 1.7 and 5.2 mg/ml

aMT6s, respectively. The interassay coefficients of variation between 10 assays were 10.8 % and 10.6 % for the 2 concentrations mentioned before. Following the rational of Klante et al. (1997), the concentration of aMT6s in each sample was referred to the concentration of creatinine as determined by means of the Jaffé test. Intraassay coefficient of variation was 1 % for a standard containing 1 mg creatinine/dl. The interassay coefficients of variation between 10 assays were 4.9 % and 4.7 % for standards containing 0.5 and 2.5 mg creatinine/dl, respectively. Urinary creatinine concentration is a rather suitable reference for aMT6s excretion, since it shows no daily variation and is a stable marker for renal clearance (Spencer 1986). Creatinine excretion is, however, directly related to muscle mass and may thus vary on a seasonal basis in European hamsters. Data were expressed in ng aMT6s per mg creatinine. For each photoperiod the following parameters were calculated: (1) profiles of aMT6s excretion from 20:00 h to 08:00 h, (2) the daily mean, (3) the maximum and (4) the duration of the nocturnal aMT6s peak. The latter was calculated as the number of hours between the lowest values of aMT6s excretion before and after the nocturnal aMT6s peak.

Locomotor activity

Immediately after weaning in August 2000, animals were housed individually in cages equipped with a running wheel. Animals were thus used to the running wheels, when the analysis of locomotor activity started in December 2000. Wheel revolutions were detected by a magnetic reed switch mounted on the wheel axle, so that a complete rotation of the wheel resulted in one impulse. Impulses were stored every 5 min on a personal computer. From these data, activity plots were made using the software ACTOGRAM (ChronoBiological Kit; Stanford Software System, USA). In order to determine seasonal changes in the activity pattern, the following calculations were done for the last 7 days of consecutive activity before each urine collection: (1) total amount of daily activity, (2) period length τ , (3) 24 h profiles, (4) activity onsets and offsets, (5) duration of activity (α), and (6) phase angles (ψ_{on}) and (ψ_{off}) between activity onset and offset and lights on and lights off, respectively. Means of daily activity and period length τ were calculated using the software ANALYZE (ChronoBiological Kit; Stanford Software System, USA).

Activity onsets and offsets were determined by fitting of the 24 h profiles with a logistic peak with the following equation (modified after (Barassin et al. 2000)):

$$f_x = \frac{A}{(1 + e^{r_B \cdot (B-x)}) \cdot (1 + e^{r_C \cdot (x-C)})}$$

f_x is the n th data point, x the time point of the n th point and A the amplitude of the nocturnal activity peak. B (activity onset) and C (activity offset) are the time points at which 50 % of the maximal increase or decrease was reached. The coefficients r_B and r_C describe the slope of the increase and decrease, respectively (Fig. 2). In case of a bi- or multi-modal activity pattern one or two additional terms representing the additional peaks were added and the B value of the first peak was used for activity onset and the C value of the last peak for activity offset. The non-linear regression analysis was performed with SigmaPlot software (SPSS ASC GmbH, Erkrath, Germany). Duration of the activity phase (alpha) was calculated as the number of h between activity onset and activity offset. The phase angles of activity onset (ψ_{on}) and offsets (ψ_{off}) were calculated by subtracting the times of the activity onset or offset from the times of sunset or sunrise on day 4 of the 7-day interval.

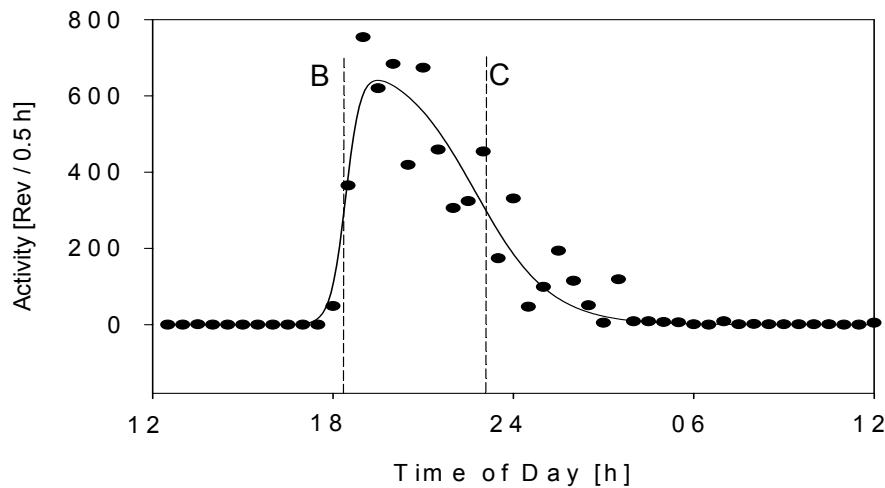


Fig. 2: Example of the non-linear regression analysis used to determine activity onsets and offsets for each 24 h activity profile. The data shown originate from an activity recording of a male European hamster just before the longest day (LD_{max}). Data points were fitted by a first-order regression line with a correlation coefficient of $r = 0.9566$. Activity onset and offset were designated as times B and C , respectively, corresponding to an activity level of 50%.

Statistical analysis

Data were analyzed by one- or two-way analyses of variance (ANOVA) for repeated measures, analyses of covariance (ANCOVA) and a multiple regression analyses (Software: STATISTICA, StatSoft, Inc., Tulsa, OK 74104, USA). Where appropriate, the LSD-test was used for post-hoc comparisons. Significant differences ($p \leq 0.05$) are indicated by one asterisk, highly significant differences ($p \leq 0.01$) by three asterisks. If not indicated otherwise, means \pm standard error of the mean ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) are given in text and figures.

RESULTS

Seasonal rhythms of reproduction and body weight

The timing of reproduction in male and female European hamsters is shown in Fig. 3. A two-way ANOVA for repeated measures followed by post-hoc comparisons (LSD-test) revealed significant differences between males and females for the termination of sexual quiescence ($p \leq 0.01$) and for the onset of the reproductive phase ($p \leq 0.01$). In males, sexual quiescence ended in early January and the reproductive phase started around the end of February. In females, sexual quiescence lasted until early March and the reproductive phase started only in early April. In contrast, no sex-differences were found for the end of reproduction and the beginning of sexual quiescence, which occurred quite simultaneously in all animals in mid-August and mid-September, respectively. The duration of the reproductive phase was longer in males (175 ± 7 d) than in females (130 ± 14 d). However, this difference did not prove significant.

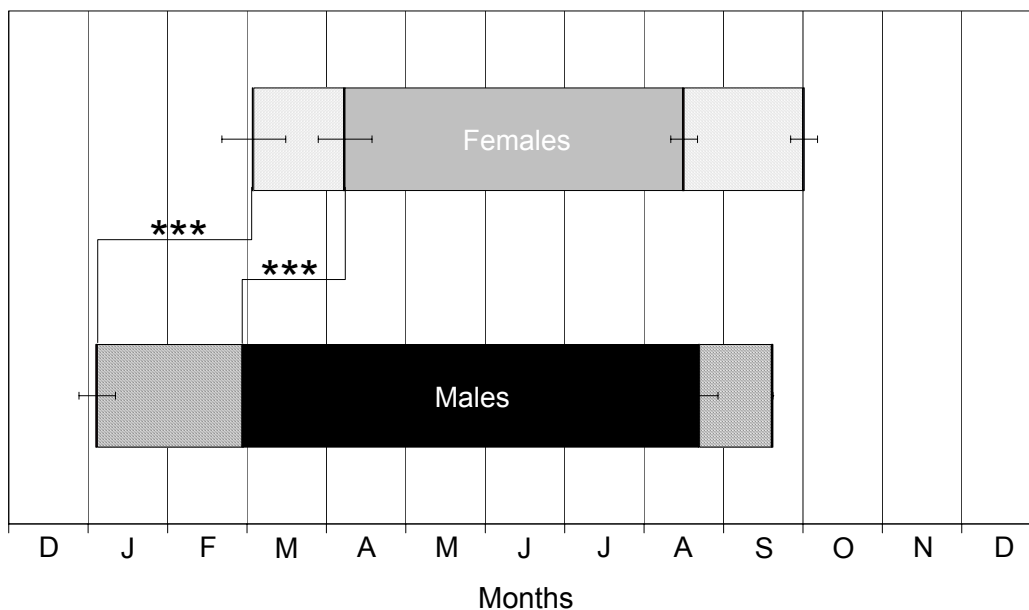


Fig. 3: Seasonal timing of reproduction in European hamsters maintained in LD_{nat} . Filled bars indicate the reproductive phase, when gonads were completely developed. Hatched bars mark the transitions between the reproductive state and sexual quiescence. Females are shown in grey, males in black. Significant differences are indicated with *** (LSD-test, $p \leq 0.01$).

Both male and female European hamsters showed seasonal changes of body weight under LD_{nat} (Fig. 4). A two-way ANOVA for repeated measures revealed a main effect of the variable photoperiod ($F_{(27,108)} = 103.72$, $p \leq 0.01$), resulting from the general increase of body weight over time. Body weight increased significantly more in males than in females (interaction photoperiod and sex: $F_{(27,108)} = 12.41$, $p \leq 0.01$). A first dramatic increase in body weight occurred during the first 2 month after weaning, i.e., between August and October. Afterwards body weights remained more or less stable until December (males) or January (females), followed by the next increase of body weight during spring and early summer. Male animals reached their maximum weight on average in mid-August, females in mid-September. However, this difference did not prove significance ($F_{(1,6)} = 2.4442$, $p = 0.1690$).

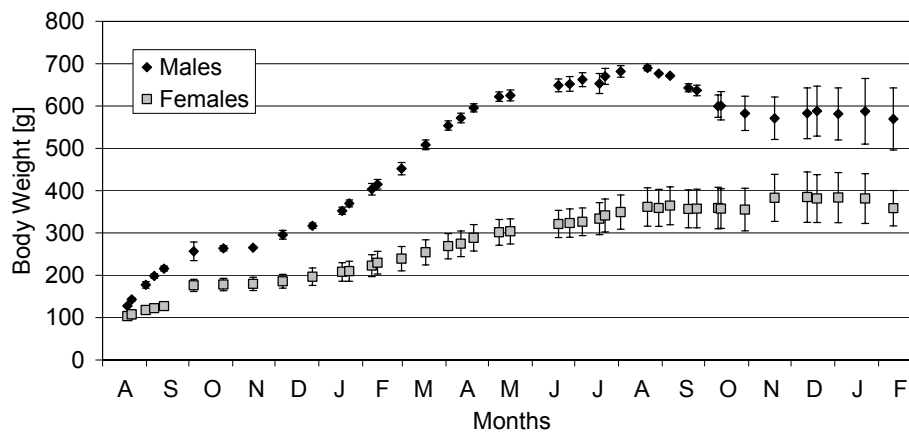


Fig. 4: Seasonal changes of body weight (means \pm SEM). Males are shown in black, females in grey.

Seasonal changes in the daily patterns of locomotor activity and urinary aMT6s excretion

Under natural lighting conditions, European hamsters showed marked annual rhythms in the daily patterns of locomotor activity and urinary aMT6s excretion (Fig. 5). In general, wheel running activity was rather high and showed a clear 24 h pattern only from the end of April to mid-July. At the same time, urinary aMT6s excretion was rather low and a clear 24 h rhythm was missing. Seasonal changes in the daily patterns of wheel running activity and urinary aMT6s excretion were thus analyzed in more detail on the basis of photoperiodic intervals, starting with the shortest photoperiod (LD_{min}) in December.

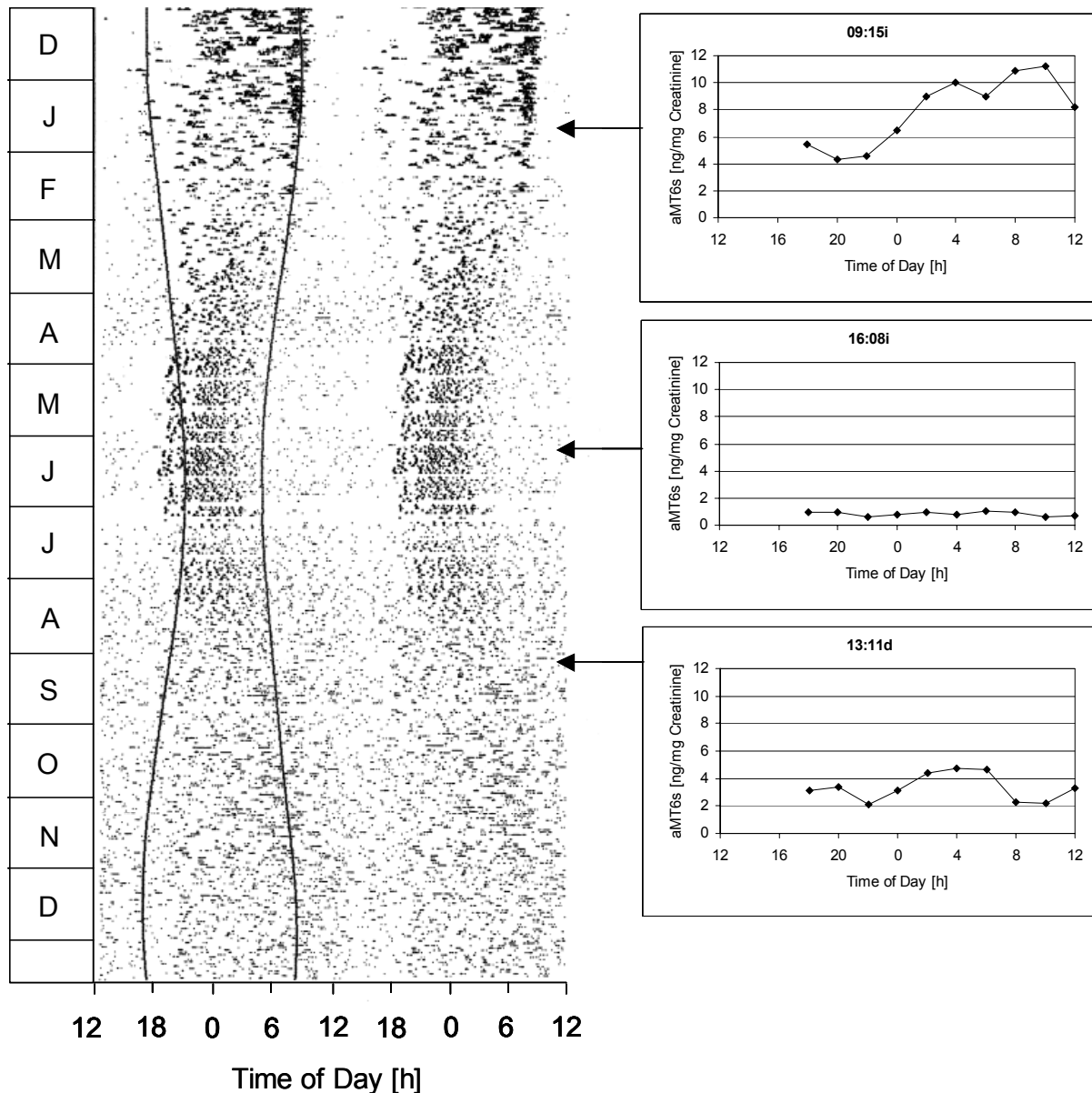


Fig. 5: Representative double-plotted locomotor activity rhythm of a European hamster kept under natural lighting conditions. Daily profiles of urinary aMT6s excretion are given on the right for characteristic photoperiods, i.e. LD09:15_i, LD16:08_i and LD13:11_d.

Fig. 6 illustrates seasonal changes of the mean daily excretion of aMT6s and creatinine in male and female European hamsters. For mean daily creatinine excretion, repeated measures ANOVA revealed significant effects of the variables photoperiod ($F_{(18,108)} = 7.183$, $p \leq 0.01$) and sex ($F_{(1,6)} = 74.989$, $p \leq 0.01$), but no significant interaction between photoperiod and sex. Mean daily creatinine excretion was higher in males than in females, most likely due to the higher amount of muscles tissue. In the course of the natural year, creatinine excretion was

significantly elevated at LD15.5:8.5_i in both males and females, whereas additional differences between photoperiods proved to be significant only in females (post-hoc LSD test, $p \leq 0.05$). However, these seasonal changes did not follow any obvious pattern.

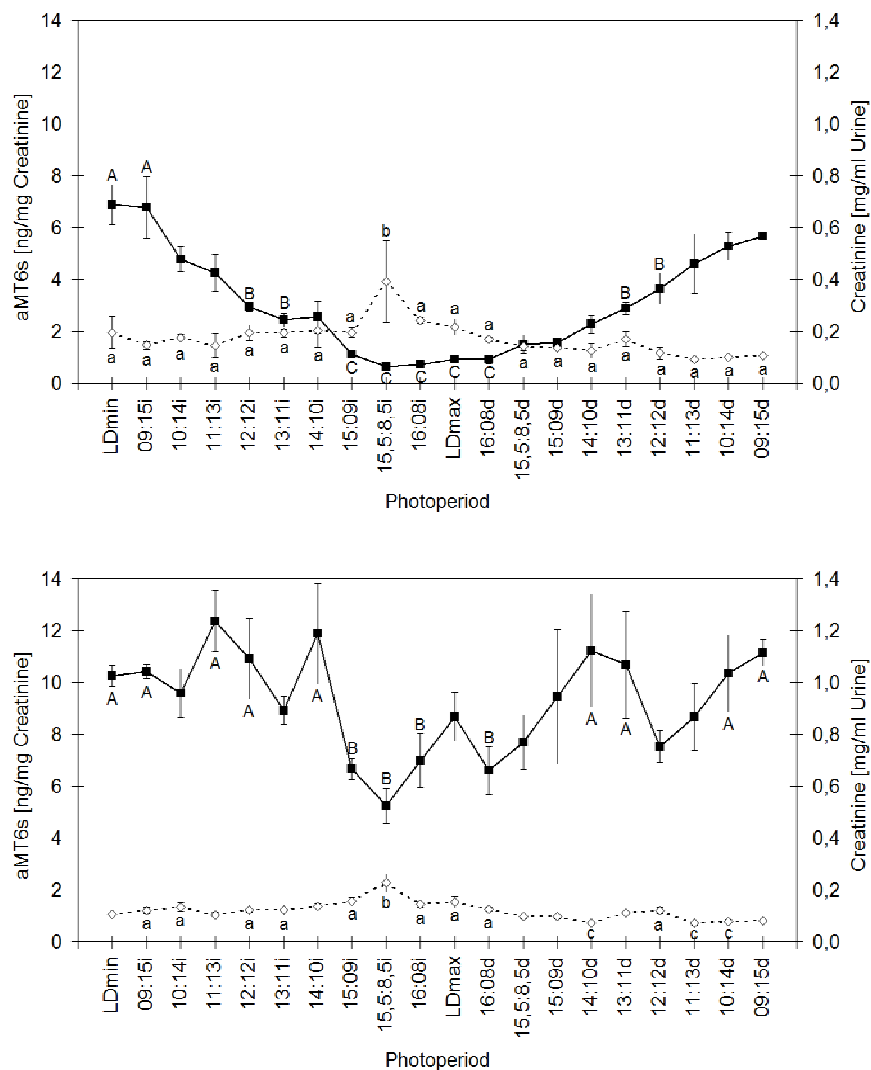


Fig. 6: Seasonal changes in the mean daily excretion (\pm SEM) of creatinine (open symbols) and aMT6s (black symbols) in male (upper graph) and female European hamsters (lower graph). Means denoted by different letters (lower cases: creatinine, upper cases: aMT6s) are significantly different ($p < 0.05$; one-way ANOVA for repeated measurements, followed by LSD-test).

Due to the significant effects of photoperiod and sex on mean daily creatinine excretion and due to the fact, that aMT6s titers were normalized with respect to the creatinine concentrations of the probes, seasonal changes of aMT6s excretion were analyzed by an analysis of covariance (ANCOVA) with creatinine as the covariate variable. The two-way

3. Ergebnisse

ANCOVA revealed significant effects of both photoperiod ($F_{(18,111)} = 3.15$, $p \leq 0.01$) and sex ($F_{(1,111)} = 166.07$, $p \leq 0.01$) on the mean daily aMT6s excretion, but no significant within-cell correlation ($F_{(18,111)} = 1.08$, $p = 0.37$, $b = -0.0028$), i.e., the observed seasonal changes in aMT6s excretion were not simply caused by parallel changes in creatinine concentrations.

In general, mean daily aMT6s excretion was significantly higher in females than in males. Because of this pronounced sex-difference, differences between photoperiods were analyzed separately for males and females (Fig. 6, Table 1). In males, the highest daily means of aMT6s were observed under very short photoperiods, i.e., at LD09:15_d, LD_{min} and LD09:15_i, while the lowest values were observed under rather long photoperiods, i.e., from LD15:09_i to LD16:08_d. Concentrations of aMT6s were even below the detection limit of the assay, i.e., 1.7 ng/ml, in many of the urine samples obtained under long photoperiods. In females, the seasonal rhythm in mean daily aMT6s excretion was not as pronounced as in males, but followed nevertheless the same pattern, i.e., mean daily aMT6s excretion was significantly lower under long photoperiods, i.e., from LD15:09_i to LD16:08_d.

	Daily Means [ng/mg Creatinine]		Peak Duration [h]		Nighttime Maximum [ng/mg Creatinine]	
	Males X ± SEM	Females X ± SEM	Males X ± SEM	Females X ± SEM	Males X ± SEM	Females X ± SEM
LD _{min}	a 6,88 ± 0,76	a 10,25 ± 0,43	a 16,00 ± 1,15	a 14,40 ± 1,17	a 9,68 ± 0,90	16,06 ± 0,67
09:15 _i	a 6,77 ± 1,19	a 10,43 ± 0,27	a 14,67 ± 1,33	a 15,20 ± 1,50	a 9,12 ± 1,66	14,96 ± 1,46
10:14 _i	4,79 ± 0,48	9,57 ± 0,95	a 14,67 ± 0,67	a 14,00 ± 0,82	6,62 ± 0,77	14,86 ± 0,81
11:13 _i	4,25 ± 0,72	a 12,36 ± 1,18	a 15,00 ± 3,00	a 14,40 ± 1,17	5,65 ± 1,10	20,22 ± 2,00
12:12 _i	b 2,93 ± 0,15	a 10,91 ± 1,56	a 15,00 ± 1,00	12,40 ± 0,40	4,42 ± 0,71	17,91 ± 2,08
13:11 _i	b 2,44 ± 0,27	8,93 ± 0,54	12,67 ± 0,67	12,80 ± 0,49	3,99 ± 0,35	13,90 ± 0,66
14:10 _i	2,55 ± 0,63	a 11,90 ± 1,94	13,33 ± 1,33	12,00 ± 1,41	4,23 ± 0,75	21,22 ± 4,36
15:09 _i	c 1,10 ± 0,08	b 6,66 ± 0,40	b 9,33 ± 2,91	b 9,60 ± 0,40	b 1,48 ± 0,20	11,21 ± 0,73
15,5:8,5 _i	c 0,64 ± 0,07	b 5,24 ± 0,68	b 7,33 ± 0,67	b 10,80 ± 1,20	b 0,96 ± 0,27	7,75 ± 0,84
16:08 _i	c 0,73 ± 0,08	b 6,98 ± 1,05	b 8,67 ± 1,76	b 10,80 ± 1,02	b 0,76 ± 0,15	10,20 ± 1,49
LD _{max}	c 0,91 ± 0,11	8,68 ± 0,93	b 8,00 ± 2,00	b 9,60 ± 1,47	b 1,28 ± 0,23	10,63 ± 1,75
16:08 _d	c 0,91 ± 0,15	b 6,60 ± 0,92	b 8,67 ± 0,67	b 9,20 ± 0,80	b 1,03 ± 0,21	8,06 ± 1,37
15,5:8,5 _d	1,51 ± 0,36	7,69 ± 1,05	b 8,00 ± 1,15	b 8,50 ± 0,96	b 1,76 ± 0,44	9,02 ± 1,01
15:09 _d	1,55 ± 0,16	9,46 ± 2,60	b 8,00 ± 1,15	b 10,80 ± 0,80	2,35 ± 0,12	22,67 ± 11,36
14:10 _d	2,26 ± 0,34	a 11,23 ± 2,17	12,67 ± 1,76	12,00 ± 0,89	3,64 ± 1,00	16,47 ± 2,93
13:11 _d	b 2,88 ± 0,23	a 10,68 ± 2,06	10,67 ± 1,33	12,40 ± 0,75	4,57 ± 0,29	23,93 ± 9,84
12:12 _d	b 3,65 ± 0,60	7,53 ± 0,62	a 15,33 ± 1,76	a 15,60 ± 0,98	5,43 ± 0,60	13,22 ± 2,05
11:13 _d	4,62 ± 1,14	8,67 ± 1,30	a 15,33 ± 0,67	a 16,00 ± 1,26	a 8,07 ± 2,10	15,44 ± 2,91
10:14 _d	5,29 ± 0,53	a 10,35 ± 1,48	a 15,00 ± 3,00	a 14,40 ± 0,75	a 7,93 ± 0,87	18,99 ± 3,74
09:15 _d	5,67	a 11,15 ± 0,51	12,00	a 16,00 ± 1,15	8,00	20,56 ± 1,76
Photoperiod	Results of one-way ANOVA for repeated measures					
	$F_{(18,36)} = 22.02$ $p < 0.01$ ***	$F_{(18,72)} = 32.41$ $p < 0.01$ ***	$F_{(18,36)} = 5.37$ $p < 0.01$ ***	$F_{(18,72)} = 5.59$ $p < 0.01$ ***	$F_{(18,36)} = 11.62$ $p < 0.01$ ***	$F_{(18,72)} = 1.62$ $p = 0.77$ ns
Sex	Results of two-way ANCOVA			Results of two-way ANOVA for repeated measures		
	$F_{(1,111)} = 166.07$ $p < 0.01$ ***			$F_{(1,6)} = 0.47$ $p = 0.52$ ns		
Photoperiod	$F_{(18,111)} = 3.15$ $p < 0.01$ ***			$F_{(18,108)} = 1.70$ $p < 0.05$ *		
Interaction	$F_{(18,111)} = 1.08$ $p = 0.37$ ns			$F_{(18,108)} = 0.86$ $p = 0.63$ ns		

Table 1: Seasonal changes in aMT6s excretion under natural light conditions. Statistical analyses are shown at the bottom with *** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$). Each letter summarizes data points of one column that do not differ significantly. Different letters mark significant differences ($p < 0,05$, LSD-Test).

As illustrated by the daily profiles of the aMT6s excretion shown in Fig. 7, seasonal changes in the mean daily aMT6s excretion were mainly caused by a pronounced decrease of the nightly aMT6s peak during long photoperiods. Especially in males, the nightly aMT6s peak disappeared completely around LD_{max}. In addition, daytime levels of aMT6s were sometimes higher than nighttime levels, for example in males between LD16:08_d and LD14:10_d and in females between LD16:08_i and LD13:11_d. With further progress of the year and decreasing photoperiod, daytime levels decreased again and a pronounced nightly aMT6s peak appeared. Additional parameters of aMT6s excretion are shown in Tab. 1. Repeated measures ANOVA revealed significant differences between males and females for the maximum nighttime value ($F_{(1,6)} = 42.92$, $p \leq 0.01$), but not for the duration of the nightly aMT6s peak ($F_{(1,6)} = 0.47$, ns). Even more important, the variable photoperiod had a significant effect on all aMT6s parameters. As revealed by post-hoc LSD-tests, all three parameters decreased significantly around LD_{max}.

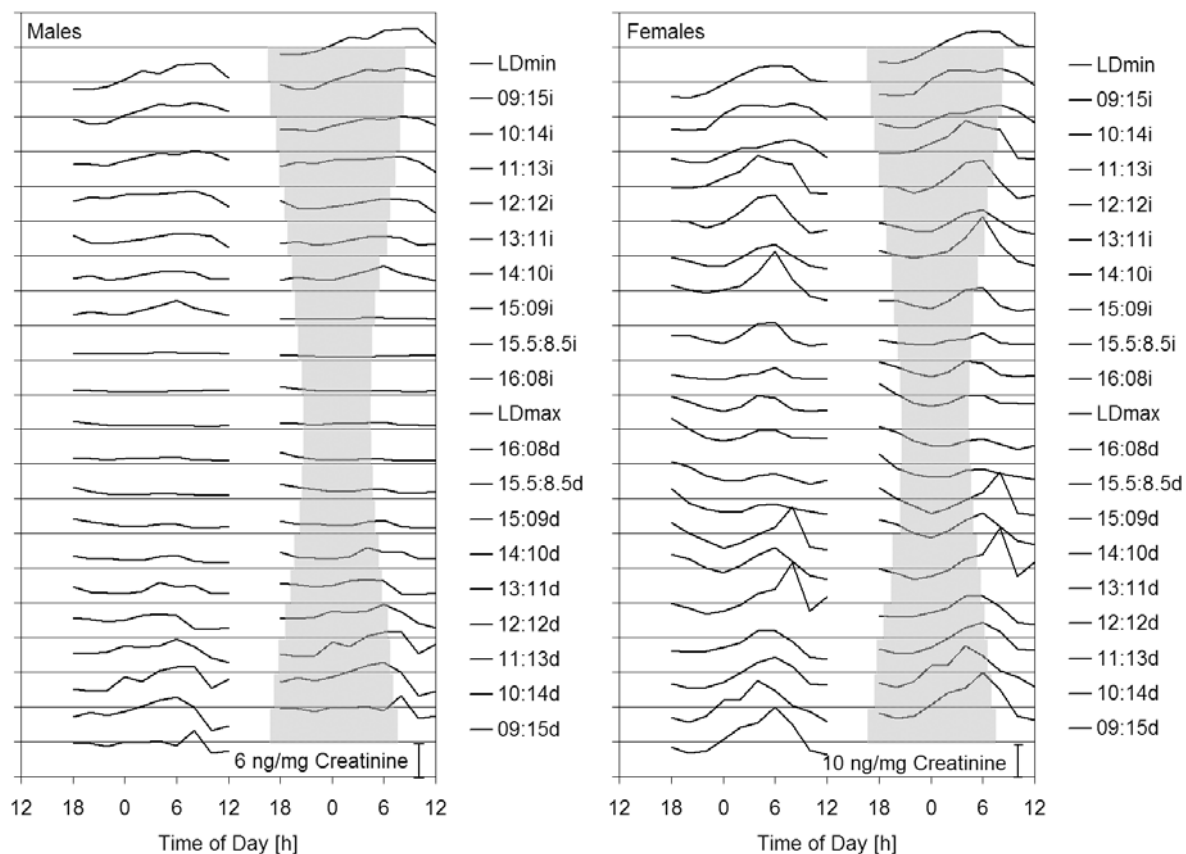


Fig. 7: Seasonal variations in the nocturnal pattern of aMT6s excretion of male (left panel) and female (right panel) European hamsters. The data are represented as a double plot. Note the different scaling in males and females. Grey shadings indicate the duration of the night, i.e. the time between sunset and sunrise under LD_{nat}.

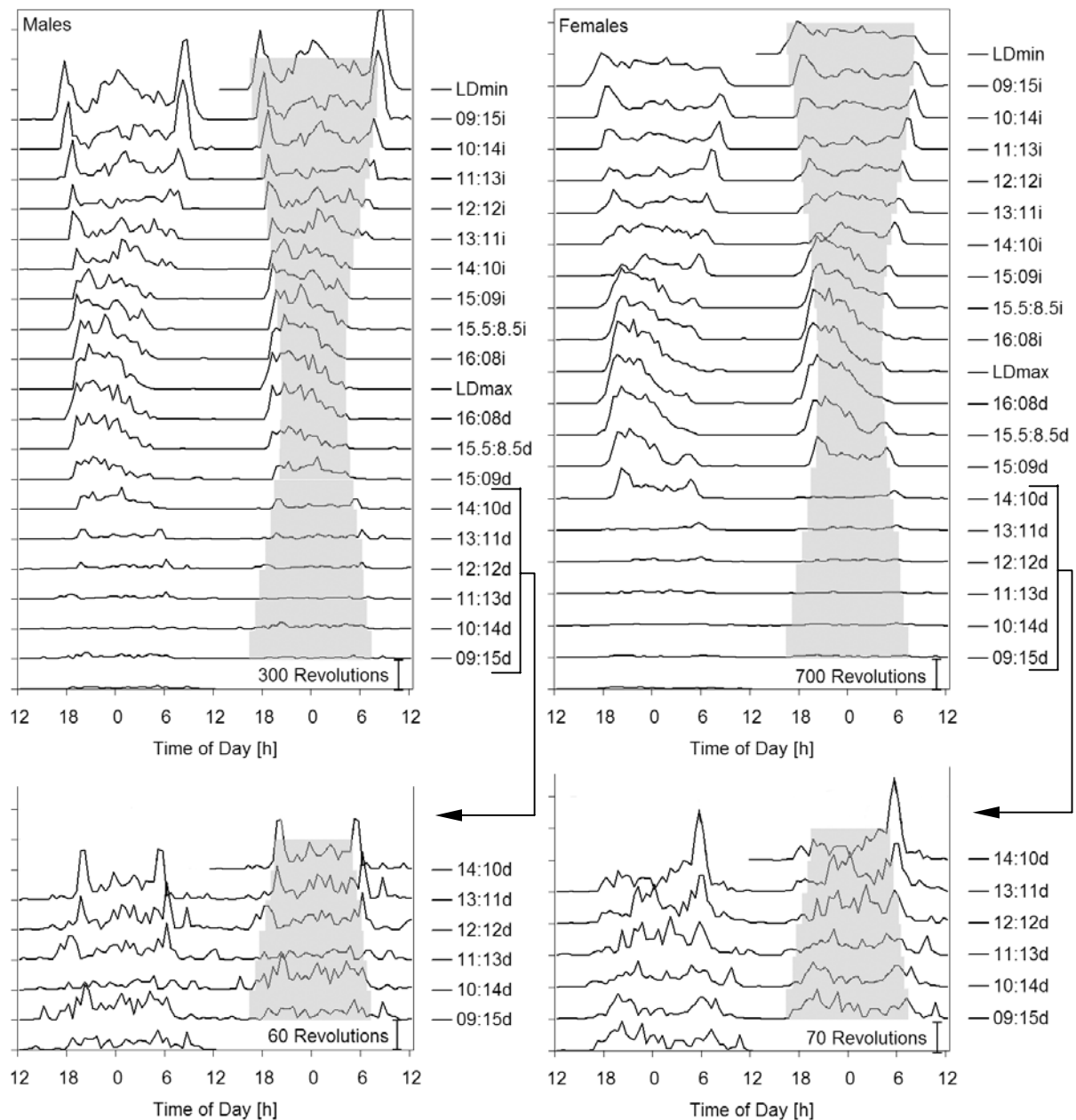


Fig. 8: Seasonal changes in the daily pattern of wheel running activity. Each profile summarizes 7 days for males (left panel) or females (right panel), respectively. The data are represented as a double plot. Note the different scaling in males and females. Grey shadings indicate the duration of the night, i.e. the time between sunset and sunrise under LD_{nat} .

Pronounced seasonal changes were also evident in the daily pattern of wheel running activity (Fig. 8) and for all of the circadian parameters analyzed (Table 2). For the daily amount of activity, repeated measures ANOVA revealed a significant effect of the variable photoperiod ($F_{(18,108)} = 6.28$, $p \leq 0.01$), but no effect of the variable sex ($F_{(1,6)} = 4.95$, ns) and no interaction between photoperiod and sex ($F_{(18,108)} = 1.08$, ns). Activity levels were highest at the

beginning of the experiment, i.e., at LD_{min}. This was most likely due to the extremely high activity levels of very young animals. Activity levels decreased continuously and remained low until a second increase occurred at LD15:09_i. Activity levels were significantly higher around the summer solstice compared to the low levels in winter. Similar effects of photoperiod were observed for the duration of activity ($F_{(15,90)} = 9.95$, $p \leq 0.01$) which was significantly shorter under long photoperiods than under short photoperiods.

Close inspection of the daily patterns of wheel running activity revealed a pronounced change in the activity pattern around LD 15:09_i, namely from a bi- or trimodal pattern with a strong activity component at sunrise to a clear unimodal pattern with an activity peak at sunset. At the same photoperiod, activity onset started to occur earlier in relation to sunset. As illustrated in Fig. 9, activity onsets and offsets were clearly phase advanced with respect to sunset and sunrise under long photoperiods. For example, at LD_{max} male and female hamsters became active 1.71 ± 0.62 h and 2.2 ± 0.29 h before sunset, whereas at LD_{min} activity began 2.19 ± 2.8 h and 2.53 ± 2.74 h after sunset. The clear unimodal activity pattern with high levels of activity and a positive phase angle ψ_{on} persisted until LD15.5:8.5_d, when activity levels decreased dramatically and the distribution of activity changed again, first into a bimodal pattern with peaks at sunrise and sunset then towards an almost arrhythmic activity pattern. Periodogram analyses revealed that period length was close to 24.0 h for most of the year. Nevertheless, repeated measures ANOVA revealed a significant effect of the variable photoperiod ($F_{(15,90)} = 2.00$, $p \leq 0.05$), because period lengths were slightly shorter than 24 h under long photoperiods and slightly longer than 24 h under short photoperiods.

In summary, wheel running activity varied seasonally in male and female European hamsters. The most obvious changes occurred in spring around LD15:09_i, when activity levels started to increase and a clear unimodal activity pattern with an early activity onset was observed. This summer-type pattern of activity persisted until LD15.5:8.5_d and was followed by a dramatic decrease of activity levels and a subsequent reversal of the previous changes in ψ_{on} and ψ_{off} and alpha.

	Daily Amount of Activity [Rev / 24h]		Activity Duration [h]		ψ Onset [h]		ψ Offset [h]		Periodlength [h]	
	Males X ± SEM	Females X ± SEM	Males X ± SEM	Females X ± SEM	Males X ± SEM	Females X ± SEM	Males X ± SEM	Females X ± SEM	Males X ± SEM	Females X ± SEM
LDmin	a 10891 ± 4287	b 16188 ± 6294	a 14,35 ± 1,81	a 13,77 ± 2,64	a -2,19 ± 1,80	a -2,53 ± 2,74	a -0,79 ± 0,22	a -0,55 ± 0,12	a 24,06 ± 0,06	a 24,04 ± 0,08
09:15i	b 6715 ± 1320	b 10384 ± 3328	a 15,31 ± 0,04	12,20 ± 2,24	-0,35 ± 0,09	a -1,52 ± 0,74	a -0,51 ± 0,12	b 1,43 ± 1,60	a 24,00 ± 0,00	23,95 ± 0,08
10:14i	b 4314 ± 790	b 9025 ± 2401	a 13,09 ± 0,56	12,07 ± 2,40	a -1,15 ± 0,58	a -1,35 ± 0,86	0,08 ± 0,40	b 0,91 ± 1,55	a 24,03 ± 0,12	24,18 ± 0,20
11:13i	2746 ± 840	6521 ± 1538	a 13,37 ± 0,11	11,82 ± 1,76	-0,42 ± 0,10	a -1,57 ± 1,18	a -0,49 ± 0,01	a -0,08 ± 0,59	a 23,96 ± 0,04	24,02 ± 0,10
12:12i	2976 ± 845	7455 ± 1836	11,92 ± 0,96	10,03 ± 2,06	a -0,77 ± 0,77	a -1,19 ± 1,11	a -0,46 ± 0,19	b 1,01 ± 0,97	a 24,28 ± 0,17	24,13 ± 0,32
13:11i	3105 ± 789	8058 ± 1557	10,19 ± 1,48	10,24 ± 1,14	a -1,00 ± 0,68	-0,53 ± 0,48	0,10 ± 0,82	0,52 ± 0,93	a 24,08 ± 0,32	24,03 ± 0,13
14:10i	3112 ± 562	6767 ± 2197	b 6,89 ± 0,54	8,80 ± 1,98	-0,42 ± 0,46	-0,66 ± 0,69	b 2,94 ± 1,00	0,79 ± 1,35	a 23,83 ± 0,05	24,12 ± 0,10
15:09i	4241 ± 878	b 10710 ± 977	b 8,43 ± 0,60	9,03 ± 0,91	0,63 ± 0,53	0,86 ± 0,30	1,41 ± 0,10	b 1,05 ± 0,96	a 23,86 ± 0,06	23,77 ± 0,03
15:5:8,5i	b 4721 ± 1181	b 12456 ± 2028	b 5,65 ± 0,15	9,28 ± 0,73	0,57 ± 0,44	0,98 ± 0,27	b 3,56 ± 0,59	0,36 ± 0,52	a 24,00 ± 0,00	23,85 ± 0,03
16:08i	b 4626 ± 956	b 13217 ± 2819	b 6,40 ± 0,72	b 7,89 ± 1,09	1,01 ± 0,50	b 1,55 ± 0,17	b 2,71 ± 0,96	b 1,76 ± 1,09	a 23,94 ± 0,06	23,92 ± 0,03
LDmax	b 4794 ± 768	b 12653 ± 2500	b 6,74 ± 1,25	b 8,53 ± 1,08	b 1,71 ± 0,62	b 2,20 ± 0,29	b 2,83 ± 1,62	b 1,52 ± 1,00	a 23,95 ± 0,03	23,98 ± 0,04
16:08d	4124 ± 1096	b 12551 ± 2739	b 6,98 ± 1,04	b 7,96 ± 0,57	b 1,38 ± 0,48	b 1,98 ± 0,37	b 2,32 ± 1,44	b 1,94 ± 0,84	a 23,86 ± 0,10	23,90 ± 0,07
15:5:8,5d	2410 ± 1145	b 9300 ± 2895	b 5,40 ± 1,00	b 8,47 ± 1,26	0,67 ± 0,63	b 1,43 ± 0,30	b 3,62 ± 1,61	b 1,31 ± 1,19	a 23,89 ± 0,06	23,97 ± 0,07
15:09d	2175 ± 701	6477 ± 2565	b 6,31 ± 0,82	b 8,03 ± 0,83	-0,32 ± 0,57	0,29 ± 0,34	2,17 ± 1,09	b 1,07 ± 0,97	b 24,72 ± 0,36	24,00 ± 0,11
14:10d	1093 ± 333	a 1387 ± 342	8,88 ± 1,47	b 7,48 ± 2,46	a -0,99 ± 1,24	c -4,44 ± 2,43	-0,12 ± 0,23	a -2,17 ± 0,77	a 24,21 ± 0,13	23,97 ± 0,16
13:11d	c 928 ± 107	a 1436 ± 397	a 11,72 ± 1,68	13,00 ± 0,07	-0,17 ± 0,14	0,91 ± 0,79	a -1,24 ± 1,82	-1,44 ± 0,77	24,29 ± 0,29	24,17 ± 0,17
12:12d	c 838 ± 129	a 1222 ± 324	a 13,57	10,51 ± 0,17	1,62	-1,05 ± 0,31	-0,25	0,14 ± 0,13	c 25,00	24,50 ± 0,08
11:13d	c 410 ± 156	a 899 ± 268		13,09 ± 1,18		0,22 ± 1,32		-0,10 ± 0,13		26,78 ± 1,66
10:14d	1052 ± 373	a 843 ± 319		a 14,62 ± 2,13		-0,36 ± 0,71		-1,23 ± 1,42		24,19 ± 0,21
09:15d	c 575 ± 150	a 973 ± 300		12,45		-2,56		0,13		25,34
Photoperiod	F _(18,36) = 4,56 p < 0,01 ***	F _(18,72) = 5,67 p < 0,01 ***	F _(15,30) = 13,62 p < 0,01 ***	F _(15,60) = 3,18 p < 0,01 ***	F _(15,30) = 2,99 p < 0,01 ***	F _(15,60) = 6,41 p < 0,01 ***	F _(15,30) = 4,43 p < 0,01 ***	F _(15,60) = 1,89 p < 0,05 *	F _(15,30) = 2,28 p < 0,05 *	F _(15,60) = 0,82 p = 0,65 ns
Sex	F _(1,6) = 4,95 p = 0,07 ns		F _(1,6) = 0,10 p = 0,76 ns	F _(1,6) = 0,03 p = 0,87 ns	F _(1,6) = 0,41 p = 0,54 ns				F _(1,6) = 3,00 p = 1,33 ns	
Photoperiod	F _(18,108) = 6,28 p = 0,39 ns		F _(15,90) = 9,95 p < 0,01 ***	F _(15,90) = 6,81 p < 0,01 ***	F _(15,30) = 4,09 p < 0,01 ***				F _(15,90) = 2,00 p < 0,05 *	
Interaction	F _(18,108) = 6,28 p = 0,39 ns		F _(15,90) = 1,30 p = 0,22 ns	F _(15,90) = 1,09 p = 0,37 ns	F _(15,90) = 1,31 p = 0,21 ns				F _(15,90) = 1,18 p = 0,29 ns	

Seasonal changes in wheel running activity under natural light conditions. Statistical analyses are shown at the bottom with *** (p < 0.01) or * (p < 0.05). Each letter summarizes data points of one column that do not differ significantly. Different letters mark significant differences (p < 0,05, LSD-Test).

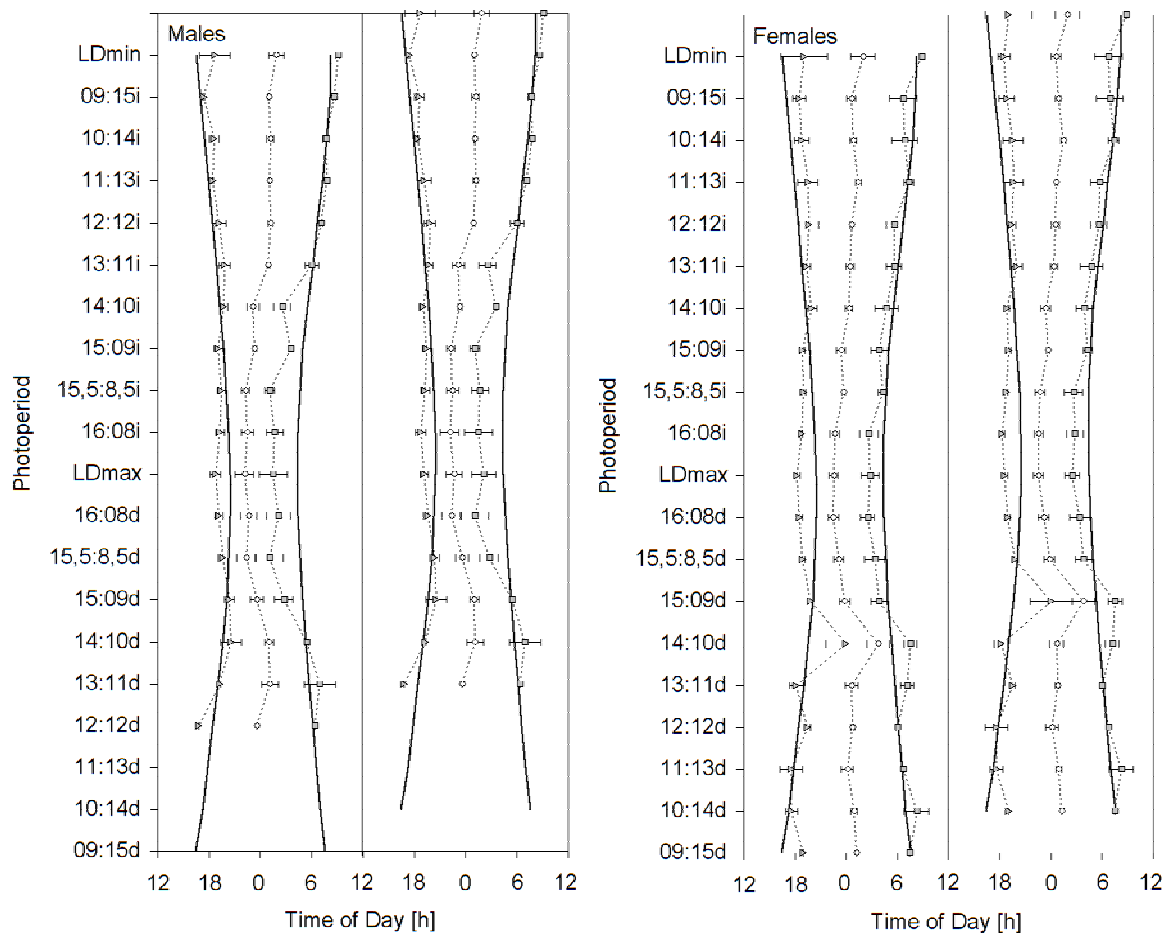


Fig. 9: Seasonal changes in activity onset and offset (\pm SEM) for male (left) and female (right) European hamsters represented as a double plot. Grey triangles mark activity onsets, open circles the mid points of activity and grey squares activity offsets. The curved lines indicate sunset and sunrise. Data points are missing for male hamsters under decreasing photoperiods, because the activity pattern became almost arrhythmic around LD12:12_d.

Temporal relation of seasonal cycles in body weight, reproductive status, aMT6s excretion and wheel running activity rhythms

Fig. 10 summarizes the seasonal changes of all circadian parameters analyzed in parallel with the annual cycles of body weight and reproduction. In addition, the grey area indicates the timing of the sensitive phase to short photoperiods (Saboureau et al. 1999), which starts in the middle of May, corresponding to a photoperiod between LD15:09_i and LD15.5:8.5_i, and ends at the end of July, i.e., around LD15.5:8.5_d, because photoperiods of less than 15.5 h day length induce gonadal regression (Canguilhem et al. 1988b). Seasonal changes in body weight correlated closely with the reproductive state. In both sexes, the largest increase in body weight was observed right after the animals were fully reproductive, while the fastest

decrease occurred with the beginning of sexual quiescence. Furthermore, maximum values in body weight were reached in males at LD14:10_d, i.e., with the end of the reproductive phase, and in females at LD13:11_d, i.e., shortly after the end of the reproductive phase. There was no temporal relation between the reproductive phase and the sensitive phase to short photoperiods. Instead, changes in circadian parameters of aMT6s and wheel running activity were clearly correlated with the timing of the sensitive phase to short photoperiods. For example, urinary aMT6s excretion was lowest at the beginning of the sensitive phase and started to increase again at its end. This effect is particularly obvious for the duration of the aMT6s peak in males and for the nighttime maximum in females. Similar changes were observed in circadian parameters of wheel running activity. Especially changes in daily amount of activity and in the phase angle of activity onset ψ_{on} coincided very well with the sensitive phase.


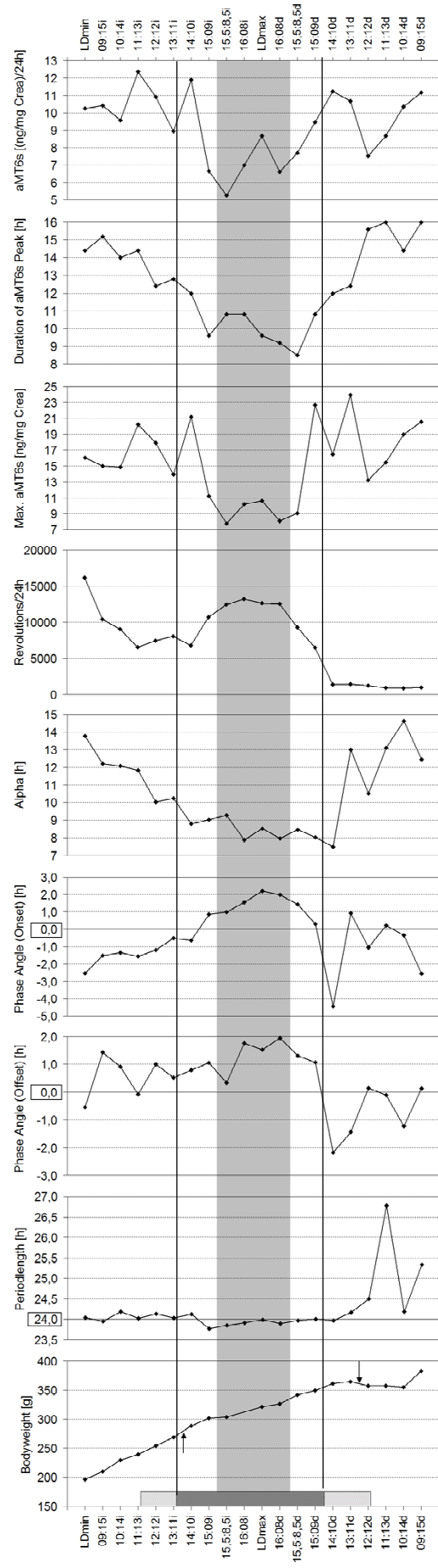
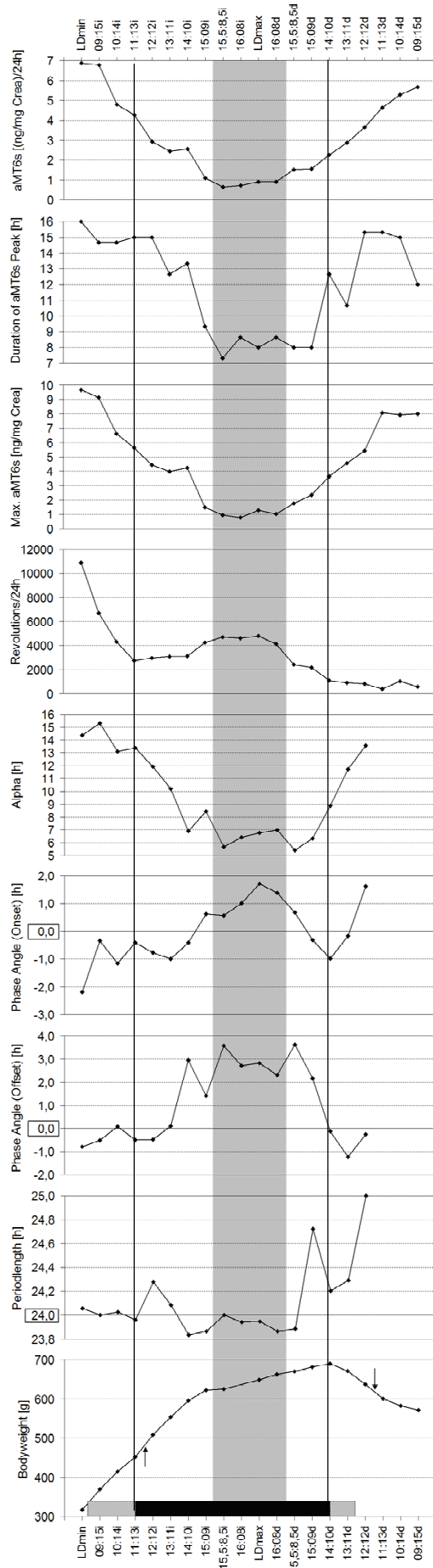


Fig. 10 (nächste Seite): Temporal relation of seasonal cycles in aMT6s excretion, wheel running activity, body weight, and reproductive status. Data for aMT6s excretion and wheel running activity were taken from Tables 1 and 2. Dark bars at the bottom indicate the reproductive phase, dashed bars the transition between reproductive state and sexual quiescence. In the bottom panel, upward and downward arrows mark the timing of the largest weight gain and weight loss, respectively. In addition, the grey area indicates the timing of the sensitive phase to short photoperiods according to (Saboureau et al. 1999).



DISCUSSION

This is the first reported study investigating the temporal relationship of seasonal changes in body weight and reproduction as well as locomotor activity and melatonin secretion in European hamsters kept under natural lighting conditions. Our study demonstrates pronounced changes in the daily patterns of locomotor activity and melatonin secretion around the summer solstice, i.e., from mid-May to mid-July. These changes are only loosely related to changes in the reproductive status of the animals. Instead, they correlate well with a period of the annual cycle during which the animals are sensitive to short days (Saboureau et al. 1999).

Seasonal cycles of reproduction and body weight

As demonstrated by field studies in Central Europe, European hamsters are reproductive from April to August (Sulzer 1774; Petzsch 1936; Krsmanovic et al. 1984; Nechay 2000). Under laboratory conditions, mating was not observed before April 15th and not after August 12th (Vohralik 1974). These findings fit well with our results, that both sexes were reproductive between mid-April and mid-August (Fig. 3). Furthermore, they validate the method used for determining the reproductive status of female hamsters, which were judged to be reproductive when the vagina was open and moist, a criterion also used in studies investigating female ground squirrels (Lee et al. 1986) and Djungarian hamsters (Lerchl et al. 1993). In our study, males had fully developed testes in late February, whereas females became reproductive only in early April, i.e., about 4 weeks later. Sex-differences have also been reported for the timing of arousal from hibernation in free-living European hamsters, ranging from early February for the oldest males to late April for females and juveniles (Ruzic 1976; Bihari 2002). It has already been demonstrated that the development of gonadal functions determines the end of the hibernating season, because high levels of gonadal hormones prevent torpor (Darrow et al. 1988; Pévet et al. 1989). It can thus be assumed that both the timing of gonadal development and the termination of the hibernation season occur approximately 1 month earlier in male than in female European hamsters. A similar timing was also observed in Richardson's ground squirrels (Michener 1992), in which/where males emerge from their hibernacula earlier than females. Before emergence, male ground squirrels spend up to 25 days in their hibernacula in an euthermic state. During that period testicular recrudescence and spermatogenesis occurs, so that the animals leave their hibernaculum with fully developed

testes. The same has been reported for European hamsters, i.e., males were sexually active when captured in the field in early April immediately after their first appearance above ground (Ruzic 1976; Buijs et al. 1986; Masson-Pévet et al. 1994; Saboureau et al. 1999).

In accordance with previous findings from laboratory studies in Strasbourg (Canguilhem et al. 1992; Masson-Pévet et al. 1994) our animals showed a seasonal rhythm in body weight with maximum values in August (males) or September (females) and minimum values in December (Fig. 4). According to the present state of knowledge, seasonal rhythms in body weight and reproduction are regulated by an endogenous circannual rhythm, because they persist after pinealectomy (Masson-Pévet et al. 1994) and under constant photoperiodic conditions (Canguilhem 1989). Nevertheless, photoperiodic information is necessary to synchronize the circannual rhythm with the natural year. Under natural light conditions gonadal regression is initiated, when the natural day length becomes shorter than 15.5 to 15.0 h (Canguilhem et al. 1988b). For locations such as Stuttgart (48°46' N) or Strasbourg (48°35' N), a photoperiod of 15.5 h is achieved by the end of July. This explains, why in the present study gonadal atrophy was observed in mid-August. A stagnation or decrease in body weight was observed some weeks later, however, this decrease is not directly related to the gonadal status of the animals because it was also observed in gonadectomized hamsters (Canguilhem et al. 1988b).

Seasonal changes in aMT6s excretion

Seasonal changes in melatonin rhythms have been reported for Djungarian hamsters and golden hamsters (Brainard et al. 1982; Steinlechner et al. 1987) and various bird species (Gwinner et al. 2001) kept under natural light conditions. It is well accepted that seasonal changes in the duration and/or the amplitude of the melatonin rhythm are used to synchronize annual rhythms with the environmental season in both photoperiodic (type I rhythms) as well as circannual species (type II rhythms), although the exact mechanism of action is still unclear (Reiter 1993; Goldman 2001; Gorman et al. 2001; Zucker 2001). Our results on seasonal changes of aMT6s secretion confirm previous findings in European hamsters that the nocturnal peak of melatonin release from the pineal is very small around the summer solstices, i.e., from mid-May to mid-July (Vivien-Roels et al. 1992; Vivien-Roels et al. 1997). However, a drawback of those previous studies was the fact that measurements of pineal and plasma melatonin concentrations were obtained by sacrificing a large number of animals. In

the present study a noninvasive method was chosen by measuring the excretion of the melatonin metabolite aMT6s in the urine of the animals (Nowak et al. 1987; Brown et al. 1991). Urinary aMT6s excretion reflects the synthesis and release of melatonin quite accurately, however, with a delay of approximately 3-4 hrs as has been demonstrated in Djungarian hamsters (Stieglitz et al. 1995) and rats (Klante et al. 1999). Bearing this in mind, the present study confirms and extends previous findings by analyzing the time course of seasonal changes in aMT6s excretion in individual animals. A nocturnal rise of aMT6s excretion with maximum values around dawn was observed from the beginning of August (LD15:09_d) to the end of April (LD14:10_i). Around the summer solstice, namely from LD15:09_i to LD15.5:8.5_d, nocturnal aMT6s excretion was completely absent in male hamsters, and reduced to only a small peak in females. These findings are almost identical to those reported by (Vivien-Roels et al. 1992; Vivien-Roels et al. 1997) for pineal and plasma melatonin concentrations in female European hamsters kept under natural and laboratory light conditions. However, one peculiarity of our results was the finding that even daytime levels changed during the course of the year. Especially in females daytime levels were higher than nighttime levels around the summer solstices (Fig. 7). Previous studies on pineal and plasma melatonin concentration did not report such an inverted melatonin pattern for European hamsters, however, they may have missed it due to the fact that sampling was restricted to either the dark period (Vivien-Roels et al. 1997) or only two times points, namely noon and midnight (Vivien-Roels et al. 1992). The finding of rather high daytime levels in aMT6s excretion is unusual, but not without precedent. For example, an inverted melatonin rhythm has recently been reported in humans with the Smith-Magenis syndrome (Potocki et al. 2000; De Leersnyder et al. 2001), a hemizygous deletion of chromosome 17, band p11.2, which results among other symptoms in sleep disorders and hyperactivity.

Wheel-running activity

Finally, the present study demonstrated pronounced changes in the daily pattern of wheel-running activity going hand in hand with the loss of nocturnal aMT6s excretion. As has been described before (Wollnik et al. 1991), a well-defined activity rhythm with high levels of activity was observed only around the summer solstice. There is, however, one minor difference between the present study and previous findings: In the present study, activity levels were rather high at the beginning of the experiment in mid-winter, whereas previous studies demonstrated a dramatic decrease in the level and in the rhythmic organization of

locomotor activity during the winter (Wollnik et al. 1991). In the present study, such an arrhythmic pattern was observed only in the second winter. This difference is most likely due to the fact, that animals used for the present study were born rather late in the breeding season and therefore did not reach sexual maturity before the experiment started in late December. Unpublished studies in our lab on different litters born from April to July revealed that most animals born late in the reproductive season showed a rather high activity level and a more or less rhythmic activity pattern during their first winter, whereas animals which were born early enough to enter and leave their first reproductive period within the first year displayed an almost arrhythmic activity pattern already in the following winter.

Nevertheless, in both cases the most dramatic changes of the activity pattern were observed in the following summer, namely between LD15:09_i and LD15.5:8.5_d. Detailed analyses of the activity pattern revealed a significant increase in the daily amount of activity, a shortening of alpha and an advance of activity onset. Seasonal changes in the activity pattern have been described for many vertebrates (Daan et al. 1975) including the Turkish hamster (Pohl 1987) (Pohl 1985) and the golden hamster (Gattermann 1985), however, in these hamster species a well-developed activity rhythms is observed during most parts of the year and the major photoperiodic effect is a lengthening and shortening of alpha. Seasonal changes in the activity pattern of European hamsters have a different quality and show more resemblance to those described for golden-mantled ground squirrels for which high activity levels and a marked phase advance of activity onset during spring and early summer have been demonstrated. In this true circannual species seasonal changes in activity onset persist under constant photoperiodic conditions (Lee et al. 1986) and they persist in gonadectomized animals, demonstrating that they are independent from the gonadal status of the animals (Lee et al. 1995). Furthermore, it has been demonstrated that the period (τ) of free-running activity rhythms varies on a circannual basis (Mrosovsky et al. 1976). It has thus been suggested that seasonal changes in the phase angle of entrainment reflect seasonal changes in the period τ of the underlying circadian pacemaker. Unpublished data from our own lab suggest a similar mechanism for European hamsters, because hamsters kept in constant darkness also displayed a free-running period τ shorter than 24 h for 2-3 months, while τ was longer than 24 h during the rest of the year. A similar although much smaller shortening of τ was also observed in the present study between LD15:09_i and LD15.5:8.5_d. We thus propose that seasonal changes of locomotor activity in the European hamsters are rather similar to those observed in golden-

mantled ground squirrels in that they reflect underlying changes of the circadian pacemaker system in the SCN. Specifically, considered together with the parallel changes in another circadian output parameter, namely aMT6s excretion, the present results strongly suggest that in European hamsters the functional state of the circadian pacemaker is altered around the summer solstice.

Temporal relationship of seasonal cycles

This brings us to the question what may be the cause for these pronounced changes in the circadian system of the European hamster. One possibility is that they simply reflect the influence of the rather long photoperiod around the summer solstices. However, this possibility can be ruled out, because it has already been demonstrated that European hamsters, which are not synchronized to the natural year, show the pronounced phase advance of activity onset and high levels of locomotor activity at a different time of the year, as for example under short photoperiods in November and December (Wollnik et al. 1991). Similarly, seasonal changes in the phase angle of locomotor activity persisted in golden-mantled ground squirrels kept under constant photoperiodic conditions (Lee et al. 1986). Finally, the nocturnal melatonin peak typical for short photoperiods persisted in European hamsters transferred from a natural winter photoperiod to long photoperiods (Vivien-Roels et al. 1997). A second possibility is that changes in the daily pattern of locomotor activity and melatonin secretion are related to the reproductive status of the animals. Steroid hormones are well known to modulate the amplitude, phase and period of circadian rhythms (Zucker 1979; Turek et al. 1982; McEachron et al. 1993). However, this possibility is also rather unlikely, because the changes observed in the locomotor activity and aMT6s rhythms are only loosely related to the reproductive cycle of the animals. For example, male animals had fully developed testes by the end of February, while females became reproductive approximately 4 weeks later, i.e. in early April. However, characteristic changes in locomotor activity and aMT6s excretion were not observed before mid-May, i.e., 6 weeks later. The same discrepancy has been found at the end of the reproductive period. The characteristic locomotor activity and aMT6s pattern lasted until the middle of July, i.e., until a photoperiod of LD15.5:8.5_d, whereas gonadal atrophy started only 4 weeks later, i.e., in mid-August.

The observed changes in the daily activity pattern and aMT6s excretion are indeed very closely related to a phase of the annual cycle, during which European hamsters are sensitive to short photoperiods. As has been demonstrated by (Canguilhem et al. 1988b), gonadal atrophy is induced by photoperiods shorter than 15.5 to 15.0 hrs. However, short photoperiods are only effective when perceived during a so-called phase of sensitivity to short days, starting in mid-May and lasting until mid-July (Saboureau et al. 1999). The parallel changes in two SCN-dependent rhythms suggest, that the functional state of the circadian pacemaker is altered during the annual phase of sensitivity to short photoperiods. This may be related to the fact, that the circadian system of European hamsters must be extremely sensitive in order to detect a decrease in photoperiod of less than an hour, namely from a day length of 16 h 11 min at the summer solstice to a day length of less than 15.5 to 15.0 hrs at the end of July. In most other species investigated so far, gonadal atrophy is induced by much shorter photoperiods as for example by a day length of 14 h in Djungarian hamsters (Hoffmann 1982; Duncan et al. 1985) or a day length of 12 h in golden hamsters (Gaston et al. 1967).

Photoperiodic time measurement

According to the present state of knowledge (Goldman 2001; Gorman et al. 2001; Zucker 2001) most seasonal organisms use circadian oscillators to measure day length. Two types of paradigms have been proposed to explain photoperiodic time measurement by a circadian mechanism, namely the external (Bünning 1936; Pittendrigh et al. 1964) and the internal coincidence model (Pittendrigh et al. 1976b). While the exact mechanism of photoperiodic time measurement is still not clear, there is no doubt that the SCN is involved in the perception and integration of photoperiodic information (Pevet et al. 1996; Schwartz et al. 2001). Indeed recent studies have shown that photoperiodic changes affect the core clock mechanisms within the SCN. For example, the mean duration of neural activity in SCN slices from Syrian hamsters is correlated to the preceding photoperiod (Jagota et al. 2000; Mrugala et al. 2000). A similar effect of ambient photoperiods has been demonstrated for the circadian rhythm of light responsiveness as measured by c-Fos photoinduction in the ventrolateral SCN. The duration of the circadian photosensitive phase in Syrian and European hamsters (Vuillez et al. 1996) and rats (Sumová et al. 1995a) is longer when entrained to short photoperiods and shorter in long photoperiods. Like melatonin and activity duration (Illnerová et al. 1984; Hastings et al. 1987; Elliott et al. 1994), the photosensitive phase expands more into the morning than into the evening when photoperiod shortens (Sumová et al. 1995b; Vuillez et al.

1996). In other words, a shortening of the photoperiod has a stronger effect on the phase angle between lights-on and the end of the photosensitive phase than on the phase angle between lights-off and the beginning of c-Fos induction. These findings suggest that light offset at dusk is important for the entrainment of the circadian system to the external LD cycle, while light onset at dawn provides the photoperiodic signal.

This hypothesis is further supported by the finding that in Siberian hamsters the direction in which the dark period is extended affects the rate of the short-day response, i.e., the expansion of the nocturnal melatonin signal and gonadal regression occurred at a faster rate, when darkness was added to morning versus evening (Hoffmann et al. 1986; Gorman et al. 1997). It has been suggested that differences in the rate of the short-day response are due to differences in the period length of two oscillatory units, one locked to the morning (M), the other to the evening (E) (Gorman et al. 1997). According to the two oscillator model of (Pittendrigh et al. 1976), the evening oscillator E controls the beginning, the morning oscillator M the end of the subjective night. Each oscillator has an intrinsic free-running period with $\tau_E < \tau_M$. Entrainment to long photoperiods forces the M close to the E oscillator, while transfer to a short photoperiod allows M and E to drift away from each other, thereby expanding nocturnal melatonin secretion and α . The more rapid short-day response after morning extension of darkness is thus explained by the fact that τ_M differs more from 24 h than τ_E , i.e., melatonin secretion and α can expand more rapidly when darkness is added to the morning.

The experimental approach of asymmetrical changes of photoperiod has also been applied to investigate the phenomenon of nonresponsiveness in Siberian hamsters (Gorman et al. 1997). Nonresponsive hamsters do not show gonadal regression or any other short-day response after transfer to short photoperiods (Puchalski et al. 1986) and a number of differences have been described between the circadian system of responsive and nonresponsive hamsters (Hoffmann et al. 1986; Puchalski et al. 1991). According to (Gorman et al. 1997) nonresponders may differ from responding hamsters in that $\tau_E > 24$ h, because they showed transient increases of α after morning, but not after evening extensions of darkness. Following the same logic, one may suggest that the pronounced changes observed in the pattern of entrainment of European hamsters also reflect changes in the period length of τ_E . The phase of sensitivity to short photoperiods is characterized by a positive phase angle of activity onset and an overall period $\tau < 24$ h suggesting that $\tau_E < 24$ h during that time. During the rest of the year, the

phase angle of activity onset is negative and the overall period $\tau > 24$ h. These changes may reflect changes in the core mechanism of the circadian clock that determine the responsiveness or the sensitivity of the circadian system to changes in photoperiod. Given the fact that European hamsters respond to changes in day length of less than 1 hour, i.e., from 16 h 11 min to 15.5 hrs, we propose that the characteristic pattern of locomotor activity and aMT6s excretion observed around the summer solstice reflects a special state of the circadian system during which the circadian pacemaker is phase locked to lights-off with a positive phase angle most likely due to the shortening of τ_E . This particular pattern of entrainment may enable the circadian system to detect even small extensions of the dark period into the morning. Such an assumption could be tested easily with asymmetrical changes of photoperiod, i.e., European hamsters should show a much slower short-day response when exposed to evening than to morning extension of darkness. In addition, one may speculate that a lengthening of τ_E at a photoperiod of LD15:09_d terminates the phase of sensitivity to short photoperiods. This assumption is supported by the present finding of a rather pronounced change in the pattern of entrainment, i.e., a lengthening of alpha and a phase shift of activity offset, immediately after perception of the short-day signal (Fig. 8+9).

In conclusion, the present study provides a detailed analysis of the temporal relationship between seasonal cycles of reproduction and body weight and seasonal changes of two circadian parameters, i.e., locomotor activity and aMT6s excretion. Our results indicate that characteristic pattern of locomotor activity and aMT6s excretion observed during the annual phase of sensitivity to short photoperiods (Saboureau et al. 1999) reflect a specific state of the circadian pacemaker system within the SCN. Further studies are necessary, to elucidate the nature of this specific state in more detail. Especially in the light of recent findings of photoperiod related changes in the expression of so-called clock genes (Messenger et al. 1999; Messenger et al. 2000; Nuesslein-Hildesheim et al. 2000; Sumová et al. 2002; Tournier et al. 2003) and a recently proposed extension of the two-oscillator model (Daan et al. 2001) it is tempting to speculate about the possibility, that seasonal changes in the circadian system of European hamsters reflect changes in the expression of clock genes. The present finding of a behavioral and physiological marker for the annual phase of sensitivity to short photoperiods should thus be a valuable tool to further characterize molecular and physiological mechanisms of photoperiodic time measurements in European hamsters.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Harald Feuchter for expert animal care, Angeline Votteler for technical assistance with the aMT6s and creatinine assays, and Andre Malan, UMR-CNRS 7518, Université Louis Pasteur, Strasbourg, for his valuable methodological help with the logistic peak fitting. This work was supported by the German Research Foundation (DFG).

REFERENCES

- Barassin S, Kalsbeek A, Saboureau M, Bothorel B, Vivien-Roels B, Malan A, Buijs RM and Pévet P (2000) Potentiation effect of vasopressin on melatonin secretion as determined by trans-pineal microdialysis in the rat. *J Neuroendocrinol* 12: 61-68
- Bartness TJ and Goldman BD (1989) Mammalian pineal melatonin: A clock for all seasons. *Experientia* 45: 939-945
- Bihari Z (2002). The wakening time of hamster (*Cricetus cricetus*) from the hibernation based on sexual differences. 10th Meeting of the International Hamster Workgroup, Tongeren (Belgium)
- Brainard GC, Petterborg LJ, Richardson BA and Reiter RJ (1982) Pineal melatonin in Syrian hamsters: Circadian and seasonal rhythms in animals maintained under laboratory and natural conditions. *Neuroendocrinology* 35: 342-348
- Brown GM, Bar-Or A, Grossi D, Kashur S, Johannson E and Yie SM (1991) Urinary 6-sulphatoxymelatonin, an index of pineal function in the rat. *J Pineal Res* 10: 141-7
- Buijs RM, Pévet P, Masson-Pévet M, Pool CW, de Vries GJ, Canguilhem B and Vivien-Roels B (1986) Seasonal variation in vasopressin innervation in the brain of the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Brain Res* 371: 193-196
- Bünning E (1936) Die endonome Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber Deutschen Bot Gesellsch* 54: 590-607
- Canguilhem B (1989) External and endogenous control of body weight rhythm in the European hamster, *Cricetus cricetus*. In: Malan A and Canguilhem B (eds) *Living in the Cold*. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd., London, pp 25-32
- Canguilhem B, Masson-Pévet M, Koehl C, Pévet P and Bentz I (1988a) Non-gonadal mediated effect of photoperiod on hibernation and body weight cycles of the European hamster. *Comp Biochem Physiol* 89A: 575-578
- Canguilhem B, Masson-Pévet M, Pévet P and Bentz I (1992) Endogenous, photoperiodic and hormonal control of the body weight rhythm in the female European hamster, *Cricetus cricetus*. *Comp Biochem Physiol* 101A: 465-470
- Canguilhem B, Vaultier J-P, Pévet P, Coumaros G, Masson-Pévet M and Bentz I (1988b) Photoperiodic regulation of body mass, food intake, hibernation, and reproduction in intact and castrated male European hamster, *Cricetus cricetus*. *J Comp Physiol A* 163: 549-557
- Daan S and Aschoff J (1975) Circadian rhythms of locomotor activity in captive birds and mammals: their variations with sex and latitude. *Oecologia* 18: 269-316
- Daan S, Albrecht U, Van der Horst GTJ, Illnerová H, Roenneberg T, Wehr TA and Schwartz WJ (2001) Assembling a clock for all seasons: Are there M and E oscillators in the genes? *J Biol Rhythms* 16: 105-116

- Darrow JM, Duncan MJ, Bartke A, Bona-Gallo A and Goldman BD (1988) Influence of photoperiod and gonadal steroids on hibernation in the European hamster. *J Comp Physiol A* 163: 339-348
- De Leersnyder H, De Blois MC, Claustrat B, Romana S, Albrecht U, Von Kleist-Retzow JC, Delobel B, Viot G, Lyonnet S, Vekemans M and Munnich A (2001) Inversion of the circadian rhythm of melatonin in the Smith-Magenis syndrome. *J Pediatr* 139: 111-6
- Duncan MJ, Goldman BD, DiPinto MN and Stetson MH (1985) Testicular function and pelage color have different critical daylengths in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Endocrinology* 116: 424-430
- Elliott JA and Tamarkin L (1994) Complex circadian regulation of pineal melatonin and wheel-running in Syrian hamsters. *J Comp Physiol A* 174: 469-484
- Garidou ML, Vivien-Roels B, Pévet P, Miguez J and Simonneaux V (2003) Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am J Physiol* 284: R1043-R1052
- Gaston S and Menaker M (1967) Photoperiodic control of hamster testis. *Science* 158: 925-928
- Gattermann R (1985) Zur Biorhythmik des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus* Waterhouse 1839) IV. Annuale Rhythmen. *Zool Jahrb Physiol* 89: 279-285
- Goldman BD (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16: 283-301.
- Gorman MR, Freeman DA and Zucker I (1997) Photoperiodism in hamsters: Abrupt versus gradual changes in day length differentially entrain morning and evening circadian oscillators. *J Biol Rhythms* 12: 122-135
- Gorman MR, Goldman BD and Zucker I (2001) Mammalian Photoperiodism. In: Takahashi JS, Turek FW and Moore RY (eds) *Handbook of Behavioral Neurobiology* (Vol. 12): *Circadian Clocks*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 481-508
- Gwinner E and Brandstätter R (2001) Complex bird clocks. *Phil Trans R Soc Lond B* 356: 1801-1810
- Hastings MH, Walker AP and Herbert J (1987) Effect of asymmetrical reductions of photoperiod on pineal melatonin, locomotor activity and gonadal condition of male Syrian hamsters. *J Endocr* 114: 221-229
- Hoffmann K (1982) The critical photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. In: Aschoff J, Daan S and Groos GA (eds) *Vertebrate Circadian Systems*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 297-304
- Hoffmann K and Illnerová H (1986) Photoperiodic effects in the Djungarian hamster: rate of testicular regression and extension of pineal melatonin pattern depend on the way of change from long to short photoperiods. *Neuroendocrinolgy* 43: 317-321

- Illnerová H, Hoffmann K and Vanecek J (1984) Adjustments of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. 38: 226-231
- Jagota A, de la Iglesia HO and Schwartz WJ (2000) Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *Nat Neurosci* 3: 372-376
- Klante G, Brinschwitz T, Secci K, Wollnik F and Steinlechner S (1997) Creatinine is an appropriate reference for urinary sulphatoxymelatonin of laboratory animals and humans. *J Pineal Res* 23: 191-197
- Klante G, Secci K, Masson-Pévet M, Pévet P, Vivien-Roels B, Steinlechner S and Wollnik F (1999) Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats. *Am J Physiol* 45: R1078-R1086
- Krsmanovic L, Mikes M, Habijan V and Mikes B (1984) Reproductive activity of *Cricetus cricetus* L. in Vojvodina - Yugoslavia. *Acta Zool Fennica* 171: 173-174
- Lee TM, Carmichael MS and Zucker I (1986) Circannual variations in circadian rhythms of ground squirrels. *Am J Physiol* 86: R831-R836
- Lee TM and Zucker I (1995) Seasonal variations in circadian rhythms persist in gonadectomized golden-mantled ground squirrels. *J Biol Rhythms* 10: 188-195
- Lerchl A and Schlatt S (1993) Influence of photoperiod on pineal melatonin synthesis, fur color, body weight, and reproductive function in the female Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 57: 359-364
- Masson-Pévet M, Naimi F, Canguilhem B, Saboureau M, Bonn D and Pévet P (1994) Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (*Cricetus cricetus*) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J Pineal Res* 17: 151-163
- Masson-Pévet M, Pévet P and Vivien-Roels B (1987) Pinealectomy and constant release of melatonin or 5-methoxytryptamine induce testicular atrophy in the European Hamster (*Cricetus cricetus*, L.). *J Pineal Res* 4: 79-88
- McEachron DL and Schull J (1993) Hormones, rhythms, and the blues. *Hormonally Induced Changes in Mind and Brain*. Academic Press, Inc., pp 287-355
- Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG and Morgan PJ (2000) Photoperiod differentially regulates the expression of *Per1* and *ICER* in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur J Neurosci* 12: 2865-2870
- Messenger S, Ross AW, Barrett F and Morgan PJ (1999) Decoding photoperiodic time through *Per1* and *ICER* gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9938-9943
- Michener GR (1992) Sexual differences in over-winter torpor patterns of Richardson's ground squirrels in natural hibernacula. *Oecologia* 89: 397-406
- Monecke S and Wollnik F (2003 in submission) European hamsters (*Cricetus cricetus*) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression.

- Mrosovsky N, Boshes M, Hallonquist JD and Lang K (1976) Circannual cycle of circadian cycles in a golden-mantled ground squirrel. *Naturwissenschaften* 63: 298-9
- Mrugala M, Zlomanczuk P, Jagota A and Schwartz WJ (2000) Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. *Am J Physiol* 278: R987-R994
- Nechay G (2000) Status of hamsters *Cricetus cricetus*, *Cricetus migratorius*, *Mesocricetus Newtoni* and other hamster species in Europe. Council of Europe, Strasbourg Cedex.
- Nowak R, McMillen IC, Redman J and Short RV (1987) The correlation between serum and salivary melatonin concentrations and urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion rates: two non-invasive techniques for monitoring human circadian rhythmicity. *Clin Endocrin* 27: 445-52
- Nuesslein-Hildesheim B, O'Brien JA, Ebling JP, Maywood ES and Hastings MH (2000) The circadian cycle of mPER clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur J Neurosci* 12: 2856-2864
- Petzsch H (1936) Beiträge zur Biologie, insbesondere Forpflanzungsbiologie des Hamsters. *Z f Kleintierkd Pelztierkd* 12: 9-83
- Pévet P (2003) Melatonin: From season to circadian signal. *J Neuroendocrinol* 15: 422-426
- Pévet P, Masson-Pévet M, Hermès MLHJ, Buijs RM and Canguilhem B (1989) Photoperiod, pineal gland, vasopressinergic innervation and timing of hibernation. In: Malan A and Canguilhem B (eds) *Living in the Cold*. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd., London, pp 43-51
- Pévet P, Pitrosky B, Vuillez P, Jacob N, Tecler-Mariam-Mesbah R, Kirsch R, Vivien-Roels B, Lakhdar-Ghazal N, Canguilhem B and Masson-Pévet M (1996) The suprachiasmatic nucleus: the biological clock of all seasons. *Prog Brain Res* 111: 369-84
- Pittendrigh CS and Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *J Comp Physiol A* 106: 333-355
- Pittendrigh CS and Daan S (1976b) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *J Comp Physiol A* 106: 333-355
- Pittendrigh CS and Minis DH (1964) The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *Am Nat* 98: 261-294
- Pohl H (1985) The circadian system of the Turkish hamster, *Mesocricetus brandti*: Responses to light. *Comp.Biochem.Physiol.[A]* 81A: 613-618
- Pohl H (1987) Circadian pacemaker does not arrest in deep hibernation. Evidence for desynchronization from the light cycle. *Experientia* 43: 293-4
- Potocki L, Glaze D, Tan DX, Park SS, Kashork CD, Shaffer LG, Reiter RJ and Lupski JR (2000) Circadian rhythm abnormalities of melatonin in Smith-Magenis syndrome. *J Med Genet* 37: 428-433

- Puchalski W and Lynch GR (1986) Evidence for differences in the circadian organization of hamsters exposed to short day conditions. *J Comp Physiol* 159: 7-11
- Puchalski W and Lynch GR (1991) Circadian characteristics of Djungarian hamsters: of photoperiodic pretreatment and artificial selection.
- Reiter RJ (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664
- Rollag MD, O'Callaghan PL and Niswender GD (1978) Serum melatonin concentrations during different stages of the annual reproductive cycle in ewes. *Biol Reprod* 18: 279-85
- Ruzic A (1976) Some peculiarities in the hibernation of the hamster (*Cricetus cricetus*) and their importance for the control of that pest. *Plant Protection (Beograd)* 27: 397-417
- Saboureau M, Masson-Pévet M, Canguilhem B and Pévet P (1999) Circannual reproductive rhythm in the European hamster (*Cricetus cricetus*): Demonstration of the existence of an annual phase of sensitivity to short photoperiod. *J Pineal Res* 26: 9-16
- Schwartz WJ, De la Iglesia HO, Zlomanczuk P and Illnerová H (2001) Encoding *le quattro stagioni* within the mammalian brain: Photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 16: 302-311
- Spencer K (1986) Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimate of creatinine. *Ann Clin Biochem* 23: 1-25
- Steinlechner S, Baumgartner I, Klante G and Reiter RJ (1995) Melatonin synthesis in the retina and pineal gland of Djungarian hamsters at different times of the year. *Neurochem Int* 27: 245-251
- Steinlechner S, Buchberger A and Heldmaier G (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: 593-597
- Stieglitz A, Spiegelhalter F, Klante G and Heldmaier G (1995) Urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion reflects pineal melatonin secretion in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Pineal Res* 18: 69-76
- Sulzer FG (1774) Versuch einer Naturgeschichte des Hamsters. Verlag Naturkunde, Hannover, Berlin-Zehlendorf.
- Sumová A, Sládek M, Jác M and Illnerová H (2002) The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. *Brain Res* 947: 260-270
- Sumová A, Trávníčková Z and Illnerová H (1995b) Memory on long but not on short days is stored in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 200: 191-194
- Sumová A, Trávníčková Z, Peters R, Schwartz W and Illnerová H (1995a) The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7754-7758

- Tournier BB, Menet JS, Dardente H, Poirel VJ, Malan A, Masson-Pévet M, Pévet P and Vuillez P (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamsters. *Neurosci* 118: 317-322
- Turek FW and Gwinner E (1982) Role of hormones in the circadian organization of vertebrates. In: Aschoff J, Daan S and Groos GA (eds) *Vertebrate Circadian Systems*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 173-182
- Vivien-Roels B, Pévet P, Masson-Pévet M and Canguilhem B (1992) Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 86: 239-247
- Vivien-Roels B, Pitrosky B, Zitouni M, Malan A, Canguilhem B, Bonn D and Pévet P (1997) Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 106: 85-94
- Vohralik V (1974) Biology of the reproduction of the common hamster, *Cricetus cricetus*. *Vest Cs Spol Zool* 38: 288-240
- Vuillez P, Jacob N, Teclerian-Mesbah R and Pévet P (1996) In Syrian and European hamsters, the duration of sensitive phase to light of the suprachiasmatic nuclei depends on the photoperiod. *Neurosci Lett* 208: 37-40
- Watson-Whitmyre M and Stetson MH (1985) A mathematical method for estimating paired testes weight from in situ testicular measurements in three species of hamsters. *Anat Rec* 213: 473-476
- Wollnik F, Breit A and Reinke D (1991) Seasonal change in the temporal organization of wheel-running activity in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Naturwissenschaften* 78: 419-422
- Wollnik F and Schmidt B (1995) Seasonal and daily rhythms of body temperature in the European hamster (*Cricetus cricetus*) under semi-natural conditions. 165: 171-82
- Zucker I (1979) Hormones and hamster circadian organization. In: Suda M, Hayaishi O and Nakagawa H (eds) *Biological Rhythms and their Central Mechanisms*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 369-381
- Zucker I (2001) Circannual Rhythms. In: Takahashi JS, Turek FW and Moore RY (eds) *Handbook of Behavioral Neurobiology* (Vol. 12): *Circadian Clocks*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 509-528

4

Zusammenfassende Diskussion

4.1 Feldhamster zeigen im Anschluss an die Gonadenregression eine vorübergehende insensitive Phase für lange Photoperioden

Diese Arbeit lieferte zwei wichtige Ergebnisse: Zum einen wurde bei den Feldhamstern eine vorübergehende Phase der Insensitivität für photoperiodische Information nach der kurztag-induzierten Gonadenregression im Herbst gezeigt. Die Daten der Gruppen I bis III belegen deutlich, dass sowohl die Männchen als auch die Weibchen nicht vor Mitte November auf das Langtagsignal reagieren konnten, obwohl bei allen Tieren die Gonaden seit September zurückgebildet waren (Abb. 3 (Monecke und Wollnik, 2004)). Dieses Ergebnis steht in klarem Gegensatz zu Beobachtungen bei anderen Hamsterspezies, bei denen die Wiederausbildung der Gonaden zu jedem Stadium der Gonadenregression durch eine lange Photoperiode stimuliert werden kann (Hoffmann, 1973, 1978; Stetson und Watson-Whitmyre, 1984).

Zum anderen wurde die Existenz einer sensitiven Phase für lange Photoperioden nachgewiesen, die Mitte November beginnt. In dieser Phase induziert ein Transfer in eine lange Photoperiode den Beginn des Gonadenwachstums innerhalb von 3 Wochen. Das Ende der sensitiven Phase kann wegen der spontanen Wiederausbildung der Gonaden im Frühjahr nicht präzise angegeben werden; die Daten von Gruppe V lassen aber erkennen, dass die sensitive Phase bis mindestens Anfang Januar dauert. So wurden einige Tiere schon vor Ende Januar spontan reproduktiv (LD_{nat} von weniger als 9 h Licht), ohne einer langen Photoperiode ausgesetzt gewesen zu sein (Abb. 2 und 3 (Monecke und Wollnik, 2004)), während ziemlich viele Weibchen erst zwischen dem 17. März und dem 20. April mit der Wiederausbildung der Gonaden begannen (Abb. 2 (Monecke und Wollnik, 2004)). Wenigstens für diese Tiere

scheint die Annahme gerechtfertigt, dass die Wiederausbildung der Gonaden durch die ansteigende Photoperiode drei Wochen vorher induziert wurde. Daher könnte die sensitive Phase zumindest bis Mitte März dauern, wenn sie nicht durch eine spontane Entwicklung der Gonaden früher beendet wird.

Außerdem geben die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise darauf, welche Photoperiode zur Stimulation des Gonadenwachstums im Frühjahr nötig ist. Der zweite Anstieg in der Anzahl der reproduktiven Weibchen im April (Abb. 2 (Monecke und Wollnik, 2004)) deutet darauf hin, dass diese Tiere drei Wochen vorher ein stimulierendes Signal erhalten haben, was einer natürlichen Photoperiode von fast 13 h Ende März entspricht (Zeitspanne zwischen Sonnenauf- und -untergang bei $48^{\circ}46' N = 12 \text{ h } 50 \text{ min}$). Außerdem zeigten alle Tiere der LD_{shift} Gruppe (Abb. 6 (Monecke und Wollnik, 2004)) erste Anzeichen der Gonadenentwicklung am 7. März, d. h. nach 70 Tagen ansteigender Photoperiode, so dass das Gonadenwachstum vermutlich durch die Photoperiode initiiert wurde, der die Tiere 3 Wochen eher, also um den 14. Februar, ausgesetzt waren. Zu diesem Zeitpunkt war die experimentelle Photoperiode 13 h und 10 min. Dagegen konnte eine Photoperiode von LD12:12 das reproduktive System (Abb. 4, Gruppe 4 (Monecke und Wollnik, 2004)) nicht stimulieren. Eine Photoperiode von ungefähr 13 h Licht scheint also sowohl ausreichend als auch notwendig zu sein, um die Wiederausbildung der Gonaden beim Feldhamster zu stimulieren. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass beim Feldhamster – ähnlich wie beim Dsungarischen Zwerghamster – der stimulierende Effekt einer gegebenen Photoperiode von der photoperiodischen Vergangenheit der Tiere abhängt. Eine Photoperiode von mehr als 13 h Licht induziert das Gonadenwachstum bei Tieren, die vorher einer kurzen Photoperiode ausgesetzt waren. Dagegen führt eine Photoperiode von 15,5 h Licht zur Gonadenregression bei Tieren, die vorher einer langen Photoperiode ausgesetzt waren (Canguilhem et al., 1988).

Dieser vergangenheitsabhängige Effekt einer mittleren Photoperioden könnte sogar die biologische Signifikanz der Existenz von zwei vorübergehenden insensitiven Phasen im Jahreszyklus des Feldhamsters erklären, während derer die Tiere weder auf lange Photoperioden (diese Arbeit) noch auf kurze Photoperioden (Saboureau et al., 1999) reagieren. In geographischen Breiten wie Stuttgart ($48^{\circ}46' N$) oder Straßburg ($48^{\circ}35' N$) wird die Gonadenregression Mitte Juli durch eine Photoperiode von weniger als 15,5 h induziert (Canguilhem et al., 1988). Vier Wochen später, d. h. Mitte August (Saboureau et al., 1999), kommt es zur Gonadenregression, nachdem sich die Photoperiode auf etwa 14,5 h verkürzt

hat. Diese Photoperiode ist deutlich länger als die kritische Photoperiode für die Stimulation des Gonadenwachstums. Die Tiere sind allerdings bis Mitte November unempfindlich gegenüber einer stimulierenden langen Photoperiode, wenn die natürliche Photoperiode bereits geringer als 9 h ist. Die vorübergehende insensitive Phase schützt daher die Tiere vor einer vorzeitigen Wahrnehmung des stimulierenden photoperiodischen Signals im Herbst. Das Gleiche gilt für den entgegengesetzten Teil des Jahreszyklus. Unter natürlichen Bedingungen sind die meisten Tiere Ende April bei einer natürlichen Photoperiode von 14 h reproduktiv. Die sensitive Phase für kurze Photoperioden beginnt allerdings erst Mitte Mai (Saboureau et al., 1999), wenn die natürliche Photoperiode 15 h überschritten hat. Wiederum bewahrt die insensitive Phase die Tiere davor, das Kurztagssignal zu einem falschen Zeitpunkt, nämlich bereits im Frühjahr, wahrzunehmen.

Eine alternative Erklärung der Ergebnisse wäre, dass Feldhamster am Ende des Sommers lediglich refraktär gegenüber langen Photoperioden werden und dass eine 1-2monatige Phase in kurzer Photoperiode nötig ist, um den refraktären Zustand zu durchbrechen und die Sensitivität für lange Photoperioden wiederherzustellen. Diese Interpretation kann allerdings ausgeschlossen werden, weil bereits gezeigt wurde, dass Feldhamster, die für mehrere Monate unter langer Photoperiode gehalten wurden, nicht nur die Gonaden spontan zurückbildeten, sondern sie nach ungefähr 3-5 Monaten auch endogen wieder entwickelten (Masson-Pévet et al., 1994b). Das Gleiche wurde bei Feldhamstern, die dauerhaft unter kurzer Photoperiode gehalten wurden, beobachtet, d. h. die Tiere zeigten eine spontane Entwicklung der Gonaden, gefolgt von einer zweiten Gonadenregression (Masson-Pévet et al., 1994b). Feldhamster sind also sowohl für Kurztag als auch für Langtag photorefraktär. Im Gegensatz zu anderen Hamsterspezies (Reiter, 1969; Stetson et al., 1977), brauchen Feldhamster allerdings keine gegensätzliche Photoperiode, um den photorefraktären Zustand zu durchbrechen. Stattdessen vermeiden sie die Wahrnehmung von unpassenden stimulierenden oder inhibierenden Photoperioden durch die Ausbildung von insensitiven Phasen gegenüber langer bzw. kurzer Photoperiode.

Als winterschlafendes Tier scheint es für den Feldhamster angebrachter zu sein, den Beginn des Gonadenwachstums im Frühjahr durch einen endogenen Timer zu kontrollieren, anstatt durch einen photoperiodischen Effekt, denn die Tiere befinden sich zum Zeitpunkt der Gonadenausbildung immer noch ohne Information über die photoperiodischen Veränderungen in der Umwelt in ihren Winterbauen. Die biologische Signifikanz einer

sensitiven Phase für lange Photoperioden könnte nichtsdestotrotz die eines Sicherungsmechanismus für diejenigen Tiere sein, deren endogener Rhythmus verzögert ist. Zusätzlich könnte die sensitive Phase als Synchronisationsmechanismus dienen, durch den der circannuale Rhythmus wieder auf ein natürliches Jahr synchronisiert werden kann. Für eine Vielzahl von Tieren mit Typ-II-Rhythmen konnte inzwischen gezeigt werden, dass diese Rhythmen durch ein oder zwei getrennte Blöcke von photoperiodischer Information auf ein Jahr synchronisiert werden können (Zucker, 2001). Beispielsweise konnte die Verabreichung von Melatonin als indirektes photoperiodisches Signal für lediglich 70 d pro Jahr die Synchronisation des Reproduktionszyklus beim Schaf aufrechterhalten.

Sowohl die Daten von (Masson-Pévet et al., 1994b) als auch die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der Transfer in eine lange Photoperiode nicht nur das Gonadenwachstum stimuliert, sondern auch die Phase des kompletten Reproduktionszyklus vorschieben kann. Bei Feldhamstern, die Mitte Oktober einer langen Photoperiode ausgesetzt wurden, war nicht nur das Gonadenwachstum, sondern auch die folgende Gonadenregression verglichen mit Kontrolltieren 2-3 Monate vorgeschoben (Abb. 12 in (Masson-Pévet et al., 1994b)). In dieser Studie begannen die meisten der LD_{shift}-Tiere mit der Gonadenregression fast gleichzeitig Ende Mai (Abb. 6 (Monecke und Wollnik, 2004)), was höchstwahrscheinlich durch die stufenweise Abnahme der Photoperiode seit dem 4. April verursacht wurde. (Saboureau et al., 1999) hat gezeigt, dass es nach einem Kurztagsignal 4 Wochen bis zum Beginn der Gonadenregression dauert und dass die Wahrnehmung des Kurztagsignals eine sensitive Phase für photoperiodische Informationen erfordert. Deshalb müssen die Tiere der LD_{shift}-Gruppe Ende April sensitiv gewesen sein, d. h. zwei Wochen bevor die sensitive Phase für kurze Photoperioden unter natürlichen Bedingungen beginnt (Saboureau et al., 1999). Das weist darauf hin, dass die sensitive Phase für kurze Photoperioden bei den LD_{shift}-Tieren ebenfalls vorgeschoben war.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich gut in eine Arbeitshypothese zur photoperiodischen Regulation des saisonalen Reproduktionszyklus des Feldhamsters einarbeiten. Gemäß dem gegenwärtigen Wissensstand, dargestellt in (Abb. 13), steuert primär ein endogener circannualer Rhythmus (~) sowohl den Übergang von der sexuellen Ruhephase während des Winterschlafs in den reproduktiven Zustand als auch den Übergang zurück in die sexuelle Ruhepause. Mittels zweier sensitiver Phasen synchronisiert die Photoperiode diesen circannualen Rhythmus. Die eine sensitive Phase beginnt Mitte Mai und dauert bis ungefähr

Mitte Juli (Saboureau et al., 1999). Während dieser Zeitspanne induziert eine Photoperiode von weniger als 15,5 – 15,0 h Licht (kritische Photoperiode nach (Canguilhem et al., 1988)) innerhalb von vier Wochen eine Gonadenregression (-). Aber auch ohne verkürzende Photoperiode zeigt die Mehrheit der Tiere eine Gonadenregression, allerdings einige Wochen später als unter natürlichen Bedingungen (Masson-Pévet et al., 1994b). Die kurze Photoperiode dient daher der Synchronisation des endogenen circannualen Rhythmus.

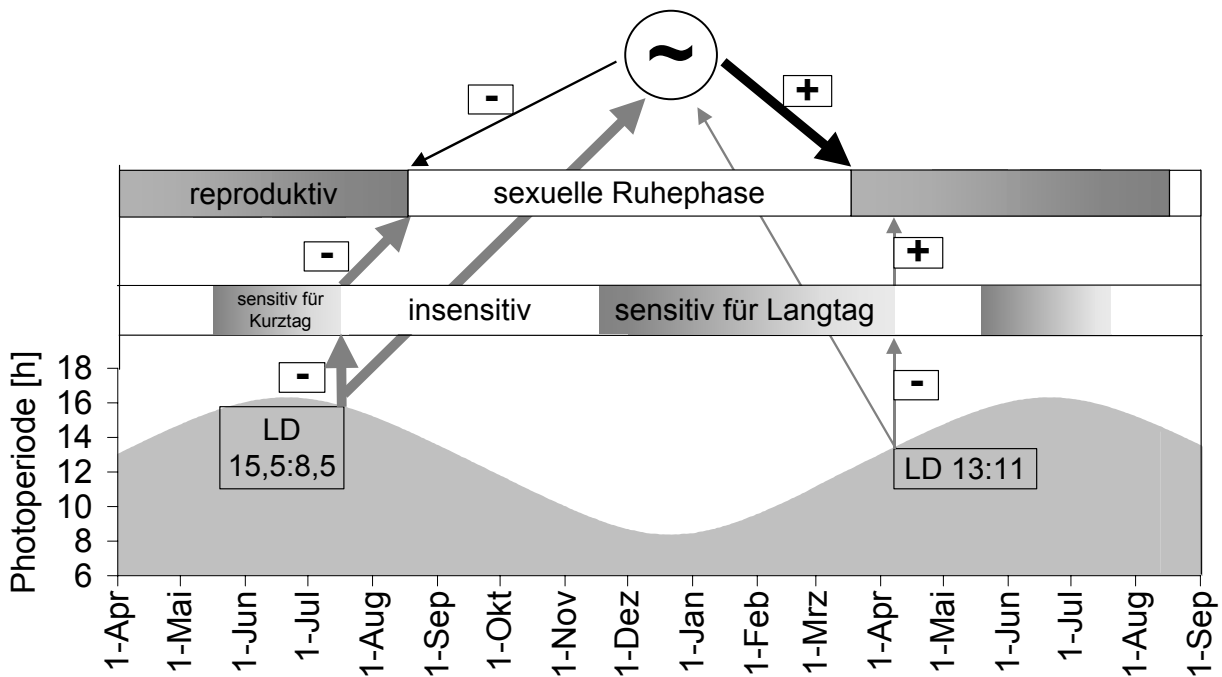


Abb. 13: Modell der Regulation des saisonalen Reproduktionszyklus des Europäischen Feldhamsters. Ein endogener circannualer Rhythmus (~) ist primär sowohl für die Steuerung des Übergangs in die sexuelle Ruhephase während des Winterschlafs als auch für den entgegengesetzten Übergang in die Reproduktionsphase verantwortlich. Die Photoperiode synchronisiert den circannualen Rhythmus mithilfe von zwei sensitiven Phasen. Unterschiedlich dicke Pfeile markieren Abstufungen in der Relevanz von endogenen und photoperiodischen Mechanismen im Timing des saisonalen Reproduktionszyklus. Siehe Text für weitere Details (aus (Monecke und Wollnik, 2004)).

Eine komplementäre sensitive Phase für lange Photoperioden beginnt Mitte November und erstreckt sich bis März oder Anfang April. Die Wahrnehmung von einer Photoperiode von mehr als 13 h (in dieser Arbeit gefundene kritische Photoperiode) führt innerhalb von 2-4 Wochen zum Beginn der Gonadenentwicklung (+). Trotzdem entwickeln die meisten Tiere

auch ohne eine länger werdende Photoperiode Gonaden, weil sie zu Beginn des Jahres gegenüber kurzen Photoperioden refraktär werden. Der Übergang in eine lange Photoperiode im Frühjahr ist daher nicht so entscheidend für die Kontrolle des saisonalen Reproduktionszyklus wie der entgegengesetzte Übergang zu kurzen Photoperioden im Sommer. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen außerdem darauf hin, dass männliche Feldhamster mehr von dem endogenen Uhrenmechanismus bei der Wiederausbildung der Gonaden abhängen, während die Steuerung bei Weibchen schwerpunktmäßig auf dem stimulierenden Effekt der Photoperiode beruht.

Die Demonstration einer jährlichen sensitiven Phase für Langtaginformation liefert ein weiteres Argument für die Hypothese von (Masson-Pévet et al., 1994b), dass der saisonale Rhythmus von Körpergewicht und Reproduktionszustand beim Europäischen Feldhamster von einem endogenen circannualen System gesteuert wird, das durch die photoperiodische Information auf das natürliche Jahr synchronisiert wird.

4.2 Saisonale Veränderungen von circadianen Rhythmen charakterisieren eine sensitive Phase für kurze Photoperioden beim Europäischen Feldhamster (*Cricetus cricetus*)

Dies ist die erste dokumentierte Arbeit, die die zeitliche Beziehung von saisonalen Veränderungen in circannualen und circadianen Parametern bei einer saisonalen Spezies, dem Feldhamster, unter natürlichen Lichtbedingungen parallel untersucht. Über einen Zeitraum von einem Jahr wurde der zeitliche Verlauf des Körpergewichts und Reproduktionszustands sowie des täglichen Aktivitätsmusters und der Melatoninsekretion dokumentiert. In der Zeit um die Sommersonnenwende, also zwischen Mitte Mai und Mitte Juli, sind ausgeprägte Veränderungen im täglichen Aktivitätsmuster und in der Melatoninsekretion zu beobachten. Die Arbeit zeigt, dass diese Veränderungen nur einen lockeren Bezug zum Reproduktionsstatus der Tiere haben. Stattdessen korrelieren sie sehr gut mit einer Phase im Jahreszyklus, während derer die Tiere sensitiv für kürzer werdende Photoperioden sind (Saboureau et al., 1999).

4.2.1 Saisonale Zyklen in der Reproduktion und im Körpergewicht

Feldstudien in Zentraleuropa ergaben, dass Feldhamster von April bis August reproduktiv sind (Sulzer, 1774; Petzsch, 1936; Krsmanovic et al., 1984; Nechay, 2000). Unter Laborbedingungen wurden Paarungen nicht vor dem 15. April und nicht nach dem 12. August beobachtet (Vohralik, 1974). Diese Befunde passen gut zu dem Ergebnis dieser Arbeit, dass die Tiere beider Geschlechter zwischen Mitte April und Mitte August reproduktiv waren (Abb. 3 (Monecke und Wollnik, in prep.)). Außerdem bestätigten sie die Methode, die benutzt wurde, um den reproduktiven Status der weiblichen Feldhamster zu bestimmen. Die Weibchen wurden als reproduktiv angesehen, wenn die Vagina geöffnet war, ein Kriterium, das auch bei Arbeiten über weibliche Ziesel (Lee et al., 1986) und weibliche Dsungarische Zwerghamster (Lerchl und Schlatt, 1993) angewendet wurde. Die Männchen hatten in dieser Studie Anfang März voll entwickelte Hoden, während die Weibchen erst Anfang April, also 4 Wochen später, reproduktiv wurden. Ein ähnlicher Geschlechtsunterschied wurde schon im ersten Ergebnisabschnitt beschrieben. Und auch bei frei lebenden Feldhamstern wurden für

das Ende des Winterschlafs Geschlechtsunterschiede festgestellt. Die ältesten Männchen erwachten bereits Anfang Februar, während die Weibchen und die spätgeborenen Jungtiere erst Ende April folgten (Ruzic, 1976). Es wurde bereits gezeigt, dass die Entwicklung der Gonadenfunktion das Ende der Winterschlafsaision bedingt, weil hohe Level an Geschlechtshormonen den Torpor beenden (Darrow et al., 1988). Daher kann angenommen werden, dass der Beginn der Gonadenentwicklung und das Ende der Winterschlafsaision bei männlichen Feldhamstern einen Monat früher als bei Weibchen stattfindet. Ein ähnliches Timing wurde beim Richardson Ziesel (*Spermophilus richardsonii*) beobachtet (Michener, 1992), bei dieser Spezies verlassen ebenfalls die Männchen den Winterbau früher als die Weibchen. Vor dem Verlassen verbringen die Männchen bis zu 25 Tage im euthermen Zustand in ihrem Winterbau. Während dieser Zeit kommt es zur Gonadenentwicklung und Spermatogenese, so dass die Tiere ihren Winterbau mit voll entwickelten Gonaden verlassen. Auch beim männlichen Feldhamster sind die Gonaden voll entwickelt, wenn sie zum ersten Mal über der Erde erscheinen (Ruzic, 1976).

In Übereinstimmung mit früheren Laborstudien aus Straßburg (Canguilhem et al., 1992; Masson-Pévet et al., 1994b) zeigten unsere Tiere einen saisonalen Rhythmus im Körpergewicht mit den höchsten Werten im August (Männchen) oder September (Weibchen) und den geringsten Werten im Dezember (Abb. 4 (Monecke und Wollnik, in prep.)). Gemäß dem gegenwärtigen Wissensstand werden beim Feldhamster saisonale Rhythmen im Körpergewicht und dem Reproduktionszustand durch einen endogenen circannualen Rhythmus reguliert, denn sie bestehen auch nach Pinealektomie (Masson-Pévet et al., 1994b) und unter konstanten photoperiodischen Bedingungen (Canguilhem, 1989) weiter. Trotzdem ist die photoperiodische Information für die Synchronisation des circannualen Rhythmus mit dem natürlichen Jahr nötig. Unter natürlichen Lichtbedingungen wird die Gonadenregression induziert, wenn die natürliche Tageslichtlänge kürzer als 15,5 oder 15,0 h wird (Canguilhem et al., 1988). In geographischen Breiten wie Stuttgart (48°46' N) oder Straßburg (48°35' N) wird eine abnehmende Photoperiode von 15,5 h Tageslicht Ende Juli erreicht. Aus diesem Grund wird dort die Gonadenatrophie Mitte August beobachtet (diese Arbeit und (Saboureau et al., 1999)). Etwa zur gleichen Zeit stagnierte die Gewichtszunahme, bzw. die Gewichtsabnahme begann. Allerdings ist die Abnahme im Gewicht nicht direkt an den Gonadenstatus gekoppelt, da sie auch bei gonadektomierten Tieren beobachtet wurde (Canguilhem et al., 1988).

4.2.2 Saisonale Veränderungen in der aMT6s Exkretion

Saisonale Veränderungen im Melatoninrhythmus wurden bei Dsungarischen Zwerghamstern (Steinlechner et al., 1987), Goldhamstern (Brainard et al., 1982) und verschiedenen Vogelarten unter natürlichen Lichtbedingungen beschrieben (Gwinner und Brandstätter, 2001). Es ist allgemein anerkannt, dass saisonale Veränderungen in der Dauer und/oder Amplitude des Melatoninsignals sowohl bei photoperiodischen als auch bei circannualen Spezies für die Synchronisation von circannualen Rhythmen auf die Umweltrhythmik genutzt werden, obwohl der exakte Mechanismus immer noch unklar ist (Reiter, 1993). Diese Arbeit bestätigt die Ergebnisse einer früheren Studie, in der gezeigt wurde, dass die Melatoninfreisetzung vom Pinealorgan um die Sommersonnenwende sehr gering ist (Vivien-Roels et al., 1992). Ein Nachteil dieser früheren Studie war, dass die Messungen von Melatonin in Plasma und Pinealorgan das Töten der Tiere erforderte, was die Verfolgung eines Jahreszyklus an individuellen Tieren ausschloss. Daher wurde in der vorliegenden Studie eine nicht-invasive Methode gewählt, indem die Exkretion eines Melatoninmetaboliten (aMT6s) im Urin der Tiere bestimmt wurde (Nowak et al., 1987; Brown et al., 1991). Die Exkretion von aMT6s im Urin spiegelt die Synthese und die Abgabe von Melatonin ziemlich genau wieder, allerdings mit einer Verzögerung von ungefähr 3-4 h, was beim Dsungarischen Zwerghamster (Stieglitz et al., 1995) und bei Ratten (Klante et al., 1999) gezeigt wurde. Die vorliegende Studie reproduziert und erweitert daher frühere Ergebnisse, indem sie den Verlauf der saisonalen Veränderungen in der aMT6s-Exkretion bei einzelnen Feldhamstern beschreibt. Ein nächtlicher Anstieg in der aMT6s-Exkretion mit Maximalwerten um den Sonnenaufgang wurde von Anfang August (LD15:09_d) bis Ende April (LD14:10_i) beobachtet. Um die Sommersonnenwende, nämlich von LD15:09_i bis LD15,5:8,5_d, gab es bei Männchen dagegen keinen nächtlichen Anstieg in der aMT6s-Exkretion und bei weiblichen Feldhamstern einen reduzierten, kleinen Peak. Das ist annähernd identisch zu den Daten von Plasma- und Pinealmelatonin-Konzentrationen bei Weibchen, die unter natürlicher Photoperiode oder Laborbedingungen gehalten wurden (Vivien-Roels et al., 1992; Vivien-Roels et al., 1997). Das Bemerkenswerte an den vorliegenden Daten war, dass auch die Tageswerte im Laufe des Jahres variierten. Um die Sommersonnenwende waren die Tageswerte sogar höher als die Nachtwerte, insbesondere bei den Weibchen (Abb. 7 (Monecke und Wollnik, in prep.)). So ein inverses Melatoninmuster wurde in keiner der früheren Arbeiten beschrieben, allerdings war dort die Sammelperiode entweder auf die

Dunkelphase (Vivien-Roels et al., 1997) oder auf zwei Zeitpunkte am Tag, nämlich mittags und mittenachts (Vivien-Roels et al., 1992), beschränkt. Die Beobachtung von relativ hohen Tageswerten in der aMT6s-Exkretion ist zwar ungewöhnlich, aber nicht ausgeschlossen: Zum Beispiel wurde kürzlich ein inverser Melatonin Rhythmus bei Menschen mit dem Smith-Magenis-Syndrom (Potocki et al., 2000; De Leersnyder et al., 2001), eine hemizygote Zerstörung des Chromosoms 17, Band p11.2, die unter anderem zu Schlafstörungen und Hyperaktivität führt, nachgewiesen.

4.2.3 Laufradaktivität

Schließlich zeigt diese Arbeit ausgeprägte Veränderungen im täglichen Muster der Laufradaktivität, die gemeinsam mit dem Verlust der nächtlichen aMT6s-Exkretion auftreten. Wie bereits beschrieben (Wollnik et al., 1991), tritt ein ausgeprägter Aktivitätsrhythmus mit einer hohen Aktivitätsmenge nur während der Sommersonnenwende auf. Allerdings gibt es einen geringfügigen Unterschied zwischen den aktuellen Ergebnissen und früheren Resultaten: In der vorliegenden Studie war die Aktivitätsmenge am Beginn des Experiments im Winter relativ hoch, während andere Studien einen drastischen Abfall in der Aktivitätsmenge und der rhythmischen Organisation der lokomotorischen Aktivität während dieser Jahreszeit feststellten (Wollnik et al., 1991). In der aktuellen Studie wurde so ein arhythmisches Muster erst im zweiten Winter beobachtet. Dieser Unterschied kommt sehr wahrscheinlich daher, dass die Tiere, die für die vorliegende Studie verwendet wurden, ziemlich spät in der vorhergehenden Paarungssaison geboren wurden und daher nicht die Geschlechtsreife erreichten, bevor das Experiment Ende Dezember startete. Eigene unveröffentlichte Beobachtungen von Würfen, die zwischen April und Juli geboren wurden, ergaben, dass die meisten Tiere, die spät in der Reproduktionsphase geboren wurden, eine ziemlich hohe Aktivitätsmenge und sogar ein mehr oder weniger rhythmisches Aktivitätsmuster in ihrem ersten Winter zeigten, während Tiere, die früh genug geboren wurden, um in ihrem ersten Lebensjahr sowohl reproduktiv zu werden, als auch am Ende der Paarungszeit wieder in die sexuelle Ruhephase zu wechseln, im ersten Winter ein nahezu arhythmisches Aktivitätsmuster ausbildeten.

In beiden Fällen ist der dramatischste Wechsel im Aktivitätsmuster allerdings im nächsten Frühjahr, nämlich zwischen LD15:09_i und LD15,5:8,5_d, zu beobachten. Detaillierte Analysen des Aktivitätsmusters ergaben einen signifikanten Anstieg in der täglichen Aktivitätsmenge,

eine Verkürzung der Aktivitätsdauer α und einen Phasenvorschub vom Beginn und Ende der Aktivität. Für viele Vertebraten (Daan und Aschoff, 1975), einschließlich dem Türkischen Hamster (Pohl, 1987) und dem Goldhamster (Gattermann, 1985), wurden saisonale Veränderungen im Aktivitätsmuster beschrieben, allerdings ist bei diesen Hamsterspezies während des größten Teils des Jahres ein gut entwickelter Aktivitätsrhythmus vorhanden und der photoperiodische Effekt beschränkt sich hauptsächlich auf eine Verlängerung und Verkürzung der Aktivitätsdauer α . Saisonale Veränderungen im Aktivitätsmuster von Feldhamstern haben eine ganz andere Qualität und zeigen mehr Ähnlichkeit zu denen, die bei Goldmantelziesel beschrieben wurden, nämlich hohe Aktivitätsmengen und ein auffälliger Phasenvorschub während des Frühjahrs und am Anfang des Sommers. Bei dieser circannualen Spezies (Pengelly, 1974) bestehen die saisonalen Veränderungen im Aktivitätsbeginn auch unter konstanter Photoperiode (Lee et al., 1986) weiter und sie bleiben sogar in gonadektomierten Tieren erhalten, was beweist, dass sie vom reproduktiven Zustand der Tiere unabhängig sind (Lee und Zucker, 1995). Außerdem wurde bei Goldmantelziesel gezeigt, dass die Periodenlänge τ der freilaufenden Aktivitätsrhythmen auf circannualer Basis variiert (Mrosovsky et al., 1976). Daher wird angenommen, dass saisonale Veränderungen im Phasenwinkel der Synchronisation saisonale Veränderungen in der Periodenlänge τ des zugrundeliegenden circadianen Schrittmachers widerspiegeln. Unveröffentlichte Daten unseres Labors lassen auf einen ähnlichen Mechanismus beim Feldhamster schließen, denn Feldhamster, die in konstanter Dunkelheit gehalten wurden, zeigten für 2-3 Monate ebenfalls eine freilaufende Periodenlänge τ , die kürzer als 24 h war, während sie im übrigen Jahr länger als 24 h war. Eine ähnliche, wenn auch geringere, Verkürzung von τ wurde auch in dieser Arbeit unter natürlichen Lichtbedingungen zwischen LD15:09_i und LD15,5:8,5_d beobachtet. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die saisonalen Veränderungen in der Laufradaktivität von Feldhamstern sehr ähnlich zu denen der Goldmantelziesel sind, und dass sie Veränderungen im zugrundeliegenden circadianen Schrittmacher, dem SCN, widerspiegeln. Wenn man zusätzlich die parallelen Veränderungen in der aMT6s-Exkretion berücksichtigt, bedeutet dies konkret, dass die vorliegenden Daten stark darauf hinweisen, dass beim Feldhamster der funktionale Status des circadianen Schrittmachers um die Sommersonnenwende verändert ist.

4.2.4 Zeitliche Beziehungen der saisonalen Zyklen

Das führt zu der Frage, was die Ursache für diese ausgeprägten Veränderungen im circadianen System des Feldhamsters sein kann. Eine Möglichkeit ist, dass sie einfach den Einfluss der relativ langen Photoperiode um die Sommersonnenwende widerspiegeln. Dieser passive Effekt kann allerdings ausgeschlossen werden, weil schon gezeigt wurde, dass Feldhamster, die nicht auf das natürliche Jahr synchronisiert waren, diesen ausgeprägten Phasenvorschub des Aktivitätsbeginns und die hohen Aktivitätsmengen zu einer anderen Jahreszeit, nämlich unter kurzer Photoperiode im November und Dezember zeigten (Wollnik et al., 1991). Außerdem bleiben bei Goldmantelzieseln unter konstanten Bedingungen die Veränderungen des Phasenwinkels der lokomotorischen Aktivität bestehen (Lee et al., 1986). Und schließlich bleibt der nächtliche Melatoninpeak, den man typischerweise unter kurzer Photoperiode bei Feldhamstern beobachtet, die von natürlicher Photoperiode im Winter in eine künstliche lange Photoperiode gebracht wurden, bestehen (Vivien-Roels et al., 1997). Eine zweite Möglichkeit ist, dass die Veränderungen im täglichen Aktivitätsmuster und der Melatoninsekretion mit dem reproduktiven Status der Tiere in Beziehung stehen. Es ist bekannt, dass Steroide die Amplitude, die Phase und die Periode des circadianen Rhythmus beeinflussen (Zucker, 1979). Diese Erklärung ist allerdings auch relativ unwahrscheinlich, weil die Veränderungen, die in der Aktivität und im aMT6s-Rhythmus beobachtet wurden, nur locker mit dem Reproduktionszyklus der Tiere in Verbindung stehen. Beispielsweise hatten die Männchen Ende Februar voll entwickelte Gonaden, während die Weibchen 4 Wochen später, Anfang April, reproduktiv wurden. Die charakteristischen Veränderungen im Aktivitätsmuster und der aMT6s-Exkretion konnten allerdings nicht vor Mitte Mai beobachtet werden. Die gleiche Diskrepanz wurde am Ende der Reproduktionszeit beobachtet. Die charakteristischen Muster in der Aktivität und in der aMT6s-Exkretion dauerten bis Mitte Juli, bis zu einer Photoperiode von ca. LD15,5:8,5_d, während die Zurückbildung der Gonaden erst 4 Wochen später, nämlich Mitte August begann.

Die beobachteten Veränderungen im täglichen Aktivitätsmuster und der aMT6s-Exkretion sind stattdessen eng mit der Phase des jährlichen Zyklus korreliert, in der Feldhamster sensitiv für kurze Photoperioden sind. Wie durch (Canguilhem et al., 1988) gezeigt wurde, wird die Gonadenregression induziert, wenn die Photoperiode unter 15,5 oder 15,0 h fällt. Allerdings sind kurze Photoperioden nur effektiv, wenn sie während einer so genannten sensitiven Phase

für Kurztag wahrgenommen werden, die Mitte Mai beginnt und Mitte Juli endet (Saboureau et al., 1999). Die parallelen Veränderungen von zwei SCN-abhängigen Rhythmen weist darauf hin, dass der funktionelle Status des circadianen Schrittmachers während der sensitiven Phase für kurze Photoperioden verändert ist. Das könnte damit zusammenhängen, dass das circadiane System der Feldhamster äußerst sensitiv sein muss, um den Abfall in der Photoperiode von weniger als einer Stunde, nämlich von 16 h 11 min an der Sommersonnenwende auf eine Tageslichtlänge von 15,5 bis 15,0 h Mitte bis Ende Juli wahrzunehmen. Bei den meisten anderen bisher untersuchten Arten wird die Gonadenregression bei viel kürzeren Photoperioden ausgelöst, z. B. beim Dsungarischen Zwerghamster bei einer Tageslichtlänge von 14 h (Hoffmann, 1982; Duncan et al., 1985) oder beim Goldhamster bei einer Tageslichtlänge von 12 h (Gaston und Menaker, 1967).

4.2.5 Photoperiodische Zeitmessung

Nach dem gegenwärtigen Wissensstand (Goldman, 2001; Gorman et al., 2001; Malpoux et al., 2001; Zucker, 2001) nutzen die meisten saisonalen Organismen den circadianen Oszillator um die Tageslichtlänge zu messen. Zwei Theorien sind in der Vergangenheit vorgeschlagen worden, um die photoperiodische Zeitmessung durch den circadianen Oszillator zu erklären, nämlich das externe (Bünning, 1936) und das interne Koinzidenzmodell (Pittendrigh und Daan, 1976b). Während der exakte Mechanismus der photoperiodischen Zeitmessung immer noch unklar ist, gibt es keinen Zweifel, dass der SCN in die Wahrnehmung und Integration der photoperiodischen Information involviert ist (Pévet et al., 1996; Schwartz et al., 2001). Tatsächlich haben jüngste Studien gezeigt, dass photoperiodische Veränderungen den zentralen Uhrenmechanismus innerhalb des SCN beeinflussen. Beispielsweise ist die durchschnittliche Dauer der neuralen Aktivität in SCN-Schnitten von Goldhamstern mit der vorangegangenen Photoperiode korreliert (Jagota et al., 2000; Mrugala et al., 2000). Ein ähnlicher Effekt der umgebenden Photoperiode wurde für den circadianen Zyklus der Lichtsensitivität (gemessen an der c-Fos Photoinduktion) im ventrolateralen SCN gezeigt. Die Dauer der circadianen photosensitiven Phase bei Gold- und Feldhamstern (Vuillez et al., 1996) und Ratten (Sumová et al., 1995) ist größer, wenn die Tiere auf kurze Photoperioden synchronisiert sind und kleiner in langen Photoperioden. Wie Melatonin und die Aktivitätsdauer α (Illnerová et al., 1984; Hastings et al., 1987; Elliott und Tamarkin, 1994), expandiert die photosensitive Phase mehr in den Morgen als in den Abend, wenn sich die Photoperiode verkürzt (Vuillez et al., 1996). Anders ausgedrückt, hat die Verkürzung der

Photoperiode einen stärkeren Effekt auf den Phasenwinkel zwischen Licht-an und dem Ende der photosensitiven Phase, als auf den Phasenwinkel zwischen Licht-aus und dem Beginn der c-Fos Induktion. Diese Erkenntnis weist darauf hin, dass das Ende der Lichtphase am Sonnenuntergang wichtiger für die Synchronisation des circadianen Systems auf den externen LD-Zyklus ist, während der Beginn der Lichtphase bei Sonnenaufgang das photoperiodische Signal liefert.

Diese Hypothese wird außerdem durch die Beobachtung unterstützt, dass bei Dsungarischen Zwerghamstern die Richtung in der die Dunkelphase ausgedehnt wurde, die Geschwindigkeit der Kurztagreaktion beeinflusste, d. h. die Expansion des nächtlichen Melatoninsignals und die Gonadenregression gingen schneller, wenn die Dauer der Dunkelheit morgens verlängert wurde, als wenn sie abends addiert wurde (Hoffmann und Illnerova, 1986; Gorman et al., 1997). Es wurde daher vermutet, dass Unterschiede in der Geschwindigkeit der Kurztagantwort durch Unterschiede in der Periodenlänge der zwei gekoppelten Oszillatoren verursacht werden, wobei der eine an den Sonnenaufgang und der andere an Sonnenuntergang gekoppelt ist (Gorman et al., 1997). Nach dem Modell der zwei gekoppelten Oszillatoren von (Pittendrigh und Daan, 1976b), kontrolliert der E-Oszillator den Beginn und der M-Oszillator das Ende der subjektiven Nacht. Jeder Oszillator hat eine intrinsische freilaufende Periodenlänge mit $\tau_E < \tau_M$. Eine Synchronisation auf lange Photoperioden drängt beide Oszillatoren dicht aneinander, während ein Transfer in eine kurze Photoperiode ihnen erlaubt auseinanderzudriften, wobei die Aktivitätsdauer α und die nächtliche Melatoninexkretion expandieren. Die schnellere Kurztagreaktion nach der Ausdehnung der Dunkelheit in die Morgenstunden kann damit erklärt werden, dass τ_M mehr von 24 h abweicht als τ_E , d. h. die Melatoninsekretion und α können schneller expandieren, wenn die Dunkelheit in den Morgen verlängert wird.

Die experimentelle Methode der asymmetrischen Veränderungen in der Photoperiode wurde außerdem genutzt, um das Phänomen der so genannten *Nonresponder* bei Dsungarischen Zwerghamstern zu untersuchen (Gorman et al., 1997). *Nonresponder* zeigen keine Gonadenregression oder andere Kurztagreaktionen nach einem Transfer in kurze Photoperiode (Puchalski und Lynch, 1986). Inzwischen wurde eine Vielzahl weiterer Unterschiede zwischen dem circadianen System von *Respondern* und *Nonrespondern* beschrieben (Hoffmann und Illnerova, 1986; Puchalski und Lynch, 1991). Nach (Gorman et

al., 1997) unterscheiden sich die *Nonresponder* von den *Respondern* darin, dass $\tau_E > 24$ h, weil sie eine vorübergehende Ausdehnung der Aktivitätsdauer α nach einer morgendlichen, aber nicht nach einer abendlichen Extension der Dunkelheit zeigten. Der gleichen Logik folgend, könnte man vermuten, dass die ausgeprägten Veränderungen im Aktivitätsmuster des Feldhamsters auch Veränderungen in der Periodenlänge τ_E widerspiegeln. Die sensitive Phase für kurze Photoperioden ist durch einen positiven Phasenwinkel im Aktivitätsbeginn und eine Gesamtperiodenlänge von $\tau < 24$ h gekennzeichnet, was darauf hindeutet, dass τ_E während dieser Zeit ebenfalls kleiner als 24 h ist (wie bei den *Repondern* der Djungarischen Hamster). Während des übrigen Jahrs ist der Phasenwinkel des Aktivitätsbeginns negativ und die Gesamtperiodenlänge $\tau > 24$ h (wie bei den *Nonrepondern* der Djungarischen Hamster). Diese Veränderungen könnten Veränderungen im zentralen Mechanismus der circadianen Uhr widerspiegeln, die das Reaktionsvermögen oder die Sensitivität des circadianen Systems für Veränderungen in der Photoperiode bestimmen. Wenn Feldhamster sogar auf Veränderungen in der Photoperiode von weniger als 1 h, also von 16 h 11 min auf 15,5 h, reagieren, kann man vermuten, dass die charakteristischen Muster der Aktivität und der aMT6s-Exkretion, die um die Sommersonnenwende beobachtet werden, einen speziellen Status des circadianen Systems widerspiegeln, währenddessen der circadiane Schrittmacher - wahrscheinlich wegen der Verkürzung von τ_E - mit einem positiven Phasenwinkel an den Sonnenuntergang gekoppelt ist. Dieses spezielle Synchronisationsmuster könnte dem circadianen System ermöglichen, sogar kleine Verlängerungen der Dunkelphase in die Morgenstunden wahrzunehmen. Diese Annahme könnte mit asymmetrischen photoperiodischen Veränderungen einfach überprüft werden, d. h. Feldhamster müssten eine viel langsamere Kurztagreaktion zeigen, wenn sie einer abendlichen Ausdehnung der Dunkelphase ausgesetzt werden, als einer morgendlichen. Außerdem könnte man darüber spekulieren, ob die Verlängerung von τ_E bei einer Photoperiode von LD15:09_d das Ende der sensitiven Phase für kurze Photoperioden darstellt. Diese Annahme wird durch die vorliegenden Daten einer ausgeprägten Veränderung im Synchronisationsmuster, also einer Verlängerung von der Aktivitätsdauer α und einer Phasenverschiebung des Aktivitätsendes direkt nach der Wahrnehmung des Kurztagsignals, unterstützt (Abb. 8 + 9 (Monecke und Wollnik, in prep.)).

Der Beginn der sensitiven Phase wird vermutlich durch das circannuale System gesteuert. Abb. 14 verdeutlicht das Zusammenspiel von circadianem und circannualen System: Die circannuale Uhr gibt das Signal für den Beginn der sensitiven Phase für Kurztag. Dadurch

kommt es im circadianen System ganz offensichtlich zu einer besonderen Konfiguration, durch die die Verkürzung der Tageslichtlänge nach der Sommersonnenwende besonders effektiv wahrgenommen werden kann. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die sensitive Phase endet, wenn es wieder einen nächtlichen Melatoninpeak gibt. In dem Moment, wo das circadiane System die Information über die abnehmende Photoperiode wahrgenommen hat, wird diese Information der circannualen Uhr über das nun wieder ausgebildete Melatoninprofil mitgeteilt.

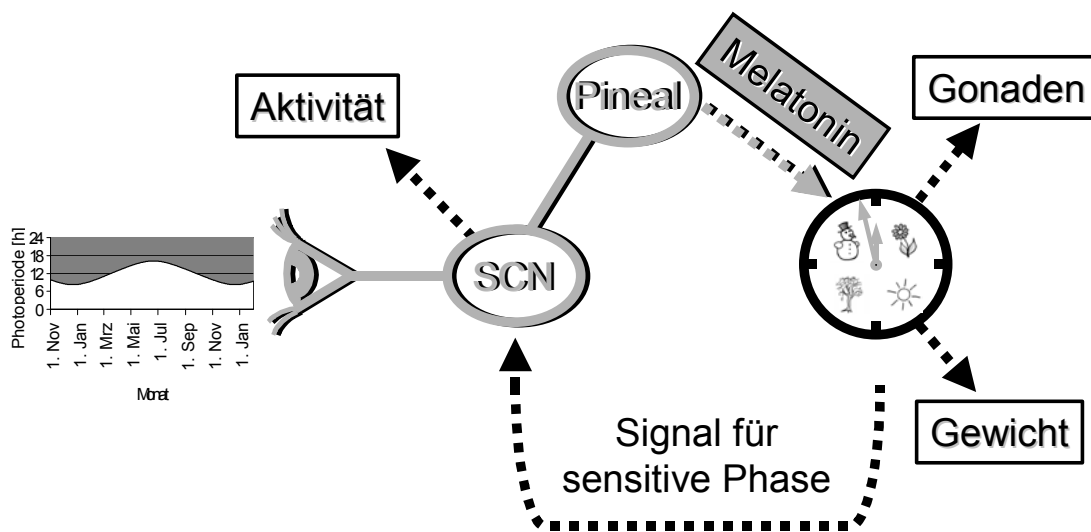


Abb. 14: Modell der Interaktion zwischen dem circadianen und dem circannualen System bei der Synchronisation saisonaler Rhythmen. Die circannuale Uhr gibt dem circadianen System das Signal für den Beginn der sensitiven Phase, was den SCN in eine besondere Konfiguration versetzt. Wenn die Verkürzung der Photoperiode wahrgenommen wird, überträgt das nun wieder ausgebildete Melatoninsignal die photoperiodische Information auf die circannuale Uhr.

4.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert eine detaillierte Analyse der zeitlichen Beziehungen zwischen saisonalen Reproduktions- und Körpergewichtszyklen und saisonalen Veränderungen von zwei circadianen Parametern, nämlich Aktivität und aMT6s-Exkretion. Die Ergebnisse zeigen, dass die charakteristischen Muster in der lokomotorischen Aktivität und der aMT6s-Exkretion, die während der jährlichen sensitiven Phase für kurze Photoperioden (Saboureau et al., 1999) beobachtet werden, einen speziellen Status des circadianen Systems im SCN widerspiegeln. Es sind weitere Studien nötig, um die Natur dieses speziellen Status detaillierter zu beschreiben. Vor allem angesichts jüngster Ergebnisse von Photoperiodegekoppelten Veränderungen in der Expression von Uhrengenen (Nuesslein-Hildesheim et al., 2000; Albrecht et al., 2001; Schwartz et al., 2001; Sumová et al., 2002; Sumová et al., 2003; Tournier et al., 2003) und einer kürzlich vorgeschlagenen Erweiterung des Modells der zwei gekoppelten Oszillatoren (Daan et al., 2001) ist es verführerisch, über die Möglichkeit zu spekulieren, dass saisonale Veränderungen im circadianen System des Feldhamsters sogar Veränderungen in der Expression der Uhrengene widerspiegeln. Die Entdeckung eines verhaltensbiologischen und physiologischen Markers für die jährliche sensitive Phase für kurze Photoperioden sollte daher ein wertvolles Instrument für die weitere Charakterisierung molekularbiologischer und physiologischer Mechanismen in der photoperiodischen Zeitmessung bei Europäischen Feldhamstern sein.

Dass in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen Veränderungen des circadianen Systems und der sensitiven Phase für lange Photoperioden im Winter gefunden wurde, heißt nicht, dass die Beteiligung des circadianen Systems an der Wahrnehmung der langen Photoperioden ausgeschlossen ist. Möglicherweise sind auch kleinere Veränderungen in den circadianen Parametern übersehen worden, weil das Experiment kein durchgehendes Winterhalbjahr einschloss. Allerdings ist zumindest für das Aktivitätsmuster unwahrscheinlich, dass es Veränderungen während des Winterhalbjahrs gibt, denn längerfristige Aufzeichnungen, die ein oder mehrere Winterhalbjahre einschlossen, ergaben zwischen August und April gleichmäßige, nahezu arhythmische Aktivitätsmuster ohne augenscheinlichen Veränderungen (eigene Beobachtungen und (Wollnik et al., 1991)). Trotzdem wäre eine Beteiligung des circadianen Systems während der sensitiven Phase für lange Photoperioden an der photoperiodischen Zeitmessung denkbar, vermutlich aber mit einem anderen Mechanismus

als im Sommer. Die ansteigende Photoperiode könnte beispielsweise mithilfe der Phase des circadianen Systems wahrgenommen werden, in der Licht zur Expression von c-Fos führt. Die Dauer dieser lichtsensitiven Phase ist von der Photoperiode abhängig (Sumová et al., 1995; Vuillez et al., 1996) und füllt beim Europäischen Feldhamster bei einer langen Photoperiode von LD16:08 die komplette Nachtphase aus, während sie unter einer kurzen Photoperiode von LD08:16 ihre maximale Ausdehnung von etwa 12-13 h der Nacht erreicht (Vuillez et al., 1996). Die Phase, in der c-Fos durch Licht induzierbar ist, ist damit nur auf $\frac{3}{4}$ der Nacht beschränkt. In Stuttgart kommt eine natürliche Photoperiode von LD08:16 um die Wintersonnenwende vor. Angenommen, die ansteigende Photoperiode wird mithilfe der c-Fos-induktiven, lichtsensitiven Phase des circadianen Systems wahrgenommen, müsste das auf die Wintersonnenwende folgende Ansteigen der Photoperiode bis zu einer Photoperiode von rund LD12:12 wirkungslos bleiben. Erst dann würde Licht in die c-Fos-induktive Phase fallen und so eine photoperiodische Reaktion auslösen. Diese Theorie passt gut zu dem Befund der vorliegenden Arbeit, dass eine Photoperiode von etwa LD13:11 für die Stimulierung des Gonadenwachstums im Frühjahr nötig ist. Während der jährlichen sensitiven Phase für lange Photoperioden wären parallele Versuche zur Bestimmung der Dauer der c-Fos-induktiven Phase und der Stimulation des Gonadenwachstums unter verschiedenen Photoperioden nötig, um diese Hypothese zu überprüfen.

Die erstmalige Entdeckung der erhöhten Tageswerte von aMT6s während der Sommermonate verdient hinsichtlich der Theorie der melatonin gesteuerten sensitiven Phase für Melatonin (Pitrosky et al., 1995; Pévet et al., 1996; Pitrosky und Pévet, 1997) ebenfalls besondere Aufmerksamkeit. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass insbesondere bei Weibchen ausschließlich während der sensitiven Phase für kurze Photoperioden (Saboureau et al., 1999) ein Melatoninpeak während der Tagphase auftrat. Dieses Ergebnis lässt sich sehr gut mit der Theorie der melatonin gesteuerten sensitiven Phase für Melatonin begründen. Nach dieser Theorie könnte der Tagespeak während der sensitiven Phase für kurze Photoperioden dazu dienen, die Sensitivität für ein nächtliches Melatoninsignal zu erhöhen. Zur Gonadenatrophie kommt es dann, wenn ein nächtliches Signal beim Wahrnehmen der kurzen Photoperiode wieder auftritt und zeitlich mit der sensitiven Phase für Melatonin zusammenfällt. Ganztägige Melatoninprofile unter natürlichen Lichtbedingungen sowie Versuche mit Melatonininjektionen während der sensitiven Phase für kurze Photoperioden bei pinealektomierten Feldhamstern sind für eine Klärung dieser Hypothese nötig.

Die Wahrnehmung der photoperiodischen Information erfolgt in zwei jährlichen sensitiven Phasen, deren Timing vermutlich von einer circannualen Uhr gesteuert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen deutlich darauf hin, dass das circadiane System an der Übermittlung der abnehmenden Photoperiode während der sensitiven Phase um die Sommersonnenwende beteiligt ist. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass das circadiane System auch die Information über die ansteigende Photoperiode während der komplementären sensitiven Phase im Frühjahr vermittelt. Das circadiane System trägt damit ganz entscheidend zur Synchronisation der circannualen Rhythmen bei. Der kürzlich beschriebene verspätete Beginn der Reproduktionszeit westeuropäischer Feldhamsterpopulationen (Weidling zitiert in (Nechay, 2000) und Weinhold, persönliche Mitteilung) könnte daher auch auf Störungen der circadianen Rhythmik zurückzuführen sein. Beispielsweise könnte die Zunahme von künstlicher Beleuchtung als Folge eines stetigen Anstiegs der Bebauung und der zunehmenden Anzahl von Straßen die Wahrnehmung der synchronisierenden, abnehmenden Photoperiode - normalerweise Mitte bis Ende Juli - derartig erschweren, dass sie von den Feldhamstern zu spät wahrgenommen wird. Als Folge kommt es zu einer Verzögerung des kompletten Jahreszyklus. Aufgrund der niedrigeren Besiedlungsdichte durch den Menschen tritt dieses Problem in den zentral- und osteuropäischen bzw. asiatischen Ländern nicht auf. Vergleichende Freilandstudien unter chronobiologischen Gesichtspunkten könnten diese Frage klären.

Abschließend sei bemerkt, dass auch bei Aussiedlungen nach einem Zuchtprogramm oder Umsiedlungsaktionen, sowie bei Fangstudien bedacht werden sollte, dass es zu Störungen im circadianen Rhythmus kommen kann. Bei einer Aussiedlung könnten sich die Beleuchtungsverhältnisse zwischen den Räumlichkeiten der Zuchtstation und dem Freiland unterscheiden. Dieser Faktor ist bei Umsiedlungen sicher weniger relevant, da die Umsiedlung in der Regel in benachbarte Flächen erfolgt. Dafür könnte ebenso wie bei Fangstudien der Aktivitätsrhythmus durch Stress beeinflusst werden. Während der sensitiven Phasen – insbesondere bei der im Sommer – scheint es daher dringend ratsam die Tiere nicht zu stören. Unterschiedliche Beleuchtungsverhältnisse sowie Kunstlicht könnten mit der Produktion und Freisetzung von Melatonin interferieren und damit die Vermittlung des Kurztagssignals an das circannuale System stören. Großer Stress beim Fangen, Um- oder Aussiedeln führt zu einer höheren Aktivität – oft in der Ruhephase der Tiere -, so dass der

präzise circadiane Rhythmus, der zur Wahrnehmung des Kurztagsignals nötig ist, für mehrere Tage gestört werden kann, denn Aktivität kann über einen Rückkopplungsmechanismus die Phasenlage der circadianen Uhr verändern (Hastings et al., 1992; Janik et al., 1994) und damit ebenfalls zu einer Störung der Synchronisation des circannualen Systems auf ein natürliches Jahr führen.

5

Literaturverzeichnis

(der Kapitel 1, 2 und 4)

- Ahrendt J (1995a) Structure of the pineal gland. In *Melatonin and the mammalian pineal gland*, J Ahrendt, ed, pp 6-26. Chapman & Hall, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Ahrendt J (1995b) Biochemistry of the pineal. In *Melatonin and the mammalian pineal gland*, J Ahrendt, ed, pp 27-65. Chapman & Hall, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Ahrendt J (1995c) Light-dark control of melatonin synthesis. In *Melatonin and the mammalian pineal gland*, J Ahrendt, ed, pp 66-109. Chapman & Hall, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Ahrendt J (1995d) Physiology of the pineal: role in photoperiodic seasonal functions. In *Melatonin and the mammalian pineal gland*, J Ahrendt, ed, pp 110-160. Chapman & Hall, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS and Lee CC (2001) *Per1* and *Per2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms* 16: 100-4.
- Amann B (2001) Ontogenese der circadianen und circannualen Aktivitätsrhythmik beim Europäischen Feldhamster, *Cricetus cricetus*. Studienarbeit; Abt. Tierphysiologie, Biologisches Institut, Universität Stuttgart.
- Armstrong SM and Redman JR (1993) Melatonin and circadian Rhythmicity. In *Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications*, HS Yu and RJ Reiter, eds, pp 187-224. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Aschoff J (1954) Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* 44: 49-56.
- Aschoff J (1960) Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 25, p. 11-28.
- Aschoff J (1963) Comparative Physiology: Diurnal Rhythms. *Annu Rev Physiol* 25: 581-600.
- Aschoff J (1979) Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol* 49: 225-249.

- Backbier LAM, Gubbels EJ, Seluga K, Weidling A, Weinhold U and Zimmermann W (1996) Der Feldhamster *Cricetus cricetus* (L., 1758) Eine stark gefährdete Tierart. In: 4. Tagung der Internationalen Arbeitsgruppe Feldhamster. Stichting Hamsterwerkgroep Limburg, Gulpen (Niederlande), p. 33.
- Bartness TJ and Goldman BD (1989) Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia* 45: 939-45.
- Beersma DGM, Daan S and Hut RA (1999) Accuracy of circadian entrainment under fluctuating light conditions: Contributions of phase and period responses. *J Biol Rhythms* 14: 320-329.
- Behrend K (2003) Das Meerschweinchen, GU Tierratgeber, Vol. 7, Gräfe und Unzer Verlag GmbH, München.
- Bihari Z (2002) The waking time of hamster (*Cricetus cricetus*) from the hibernation based on sexual differences. In: S Mercelis, A Kayser and G Verbeylen (Eds), 10th Meeting of the International Hamster Workgroup, Tongeren (Belgium).
- Bittman EL, Dempsey RJ and Karsch FJ (1983) Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 113: 2276-83.
- Boulos Z and Rusak B (1982) Phase-response curves and the dual-oscillator model of circadian pacemakers. In *Vertebrate Circadian Systems*, J Aschoff, D S. and GA Groos, eds, pp 215-223. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Bovet J and Oertli E (1974) Free-running circadian activity rhythms in free-living beaver (*Castor canadensis*). *J Comp Physiol* 92: 1-10.
- Brainard GC, Petterborg LJ, Richardson BA and Reiter RJ (1982) Pineal melatonin in Syrian hamsters: Circadian and seasonal rhythms in animals maintained under laboratory and natural conditions. *Neuroendocrinology* 35: 342-348.
- Brandes K, Fend F, Monecke S, Teifke JP, Breuer W and Hermanns W (in press) Comparative morphological and immunohistochemical investigation of spontaneously occurring thymomas in a colony of European hamsters. *Vet Path*: in press.
- Brehm A (1914), *Brehms Tierleben*, Vol. 11, Säugetiere, 2. Band. 4. Auflage, Neubearbeitet von Heck, L. und Hilzheimer, M., Bibliographisches Institut Meyer, Leipzig, Wien.
- Brown GM, Bar-Or A, Grossi D, Kashur S, Johannson E and Yie SM (1991) Urinary 6-sulphatoxymelatonin, an index of pineal function in the rat. *J Pineal Res* 10: 141-7.
- Bünning E (1936) Die endonome Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 54: 590-607.
- Canguilhem B (1989) External and endogenous control of body weight rhythm in the European hamster, *Cricetus cricetus*. In *Living in the Cold*, A Malan and B Canguilhem, eds, pp 25-32. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd., London.

- Canguilhem B and Bloch R (1966) Évolution saisonnière de l'élimination des hormones surrénaliennes chez un hibernant, *Cricetus cricetus*. In *Comptes rendus des séances de la société de Biologie*, pp 27-44.
- Canguilhem B, Masson-Pévet M, Pévet P and Bentz I (1992) Endogenous, photoperiodic and hormonal control of the body weight rhythm in the female European hamster, *Cricetus cricetus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 101A: 465-470.
- Canguilhem B, Vaultier J-P, Pévet P, Coumaros G, Masson-Pévet M and Bentz I (1988) Photoperiodic regulation of body mass, food intake, hibernation, and reproduction in intact and castrated male European hamster, *Cricetus cricetus*. *J Comp Physiol A* 163: 549-557.
- Card JP and Moore RY (1991) The organization of visual circuits influencing the circadian activity of the suprachiasmatic nucleus. In *Suprachiasmatic nucleus - The mind's clock*, DC Klein, RY Moore and SM Reppert, eds, pp 51-76. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Carmichael MS and Zucker I (1986) Circannual rhythms of ground squirrels: a test of the frequency demultiplication hypothesis. *J Biol Rhythms* 1: 277-284.
- Cassone VM, Chesworth MJ and Armstrong SM (1986a) Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* 36: 1111-1121.
- Cassone VM, Chesworth MJ and Armstrong SM (1986b) Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J Biol Rhythms* 1: 219-29.
- Concannon PW, Parks JE, Roberts PJ and Tennant BC (1992) Persistent free-running circannual reproductive cycles during prolonged exposure to a constant 12L:12D photoperiod in laboratory woodchucks (*Marmota monax*). *Lab Anim Sci* 42: 382-91.
- Craft CM (1993) Molecular Biology of the Pineal Gland: Melatonin Synthesizing Enzymes. In *Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications*, HS Yu and RJ Reiter, eds, pp 17-38. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Daan S (1981) Adaptive daily strategies in behavior. In *Handbook of Behavioral Neurobiology: Biological Rhythms*, J Aschoff, ed, pp 275-298. Plenum Press, New York.
- Daan S (1985) Tonic and phasic effects of light in the entrainment of circadian rhythms. *Ann NY Acad Sci* 453: 51-58.
- Daan S (2000) Colin Pittendrigh, Jürgen Aschoff, and the natural entrainment of circadian systems. *J Biol Rhythms* 15: 195-207.
- Daan S, Albrecht U, Van der Horst GTJ, Illnerová H, Roenneberg T, Wehr TA and Schwartz WJ (2001) Assembling a clock for all seasons: Are there M and E oscillators in the genes? *J Biol Rhythms* 16: 105-116.

- Daan S and Aschoff J (1975) Circadian Rhythms of Locomotor Activity in Captive Birds and Mammals: Their Variations with Season and Latitude. *Oecologia* 18: 269-316.
- Daan S and Pittendrigh CS (1976b) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. III. Heavy water and constant light: Homeostasis of frequency? *J Comp Physiol A* 106: 267-290.
- Dark J, Johnston PG, Healy M and Zucker I (1983) Latitude of origin influences photoperiodic control of reproduction of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Biol Reprod* 28: 213-20.
- Dark J, Pickard GE and Zucker I (1985) Persistence of circannual rhythms in ground squirrels with lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 332: 201-7.
- Darrow JM, Duncan MJ, Bartke A, Bona-Gallo A and Goldman BD (1988) Influence of photoperiod and gonadal steroids on hibernation in the European hamster. *J Comp Physiol A* 163: 339-348.
- Darrow JM and Goldman BD (1985) Circadian regulation of pineal melatonin and reproduction in the Djungarian hamster. *J Biol Rhythms* 1: 39-54.
- De Leersnyder H, De Blois MC, Claustrat B, Romana S, Albrecht U, Von Kleist-Retzow JC, Delobel B, Viot G, Lyonnet S, Vekemans M and Munnich A (2001) Inversion of the circadian rhythm of melatonin in the Smith-Magenis syndrome. *J Pediatr* 139: 111-6.
- de Mairan JJ (1729) Observation botanique. In *Histoire de l'Academie Royale des Sciences, Paris*, pp 35-36.
- de Vries S (2002) Breeding and reintroduction of the Common Hamster in the Netherlands. In: S Mercelis, A Kayser and G Verbeylen (Eds), 10th Meeting of the International Hamster Workgroup, Tongeren (Belgium).
- Delonge H-J (2002) "Hamsterstreit" um Gewerbepark Avantis beendet. In: Aachener Zeitung, 06.02.02, Aachen.
- Duncan MJ, Goldman BD, Di Pinto MN and Stetson MH (1985) Testicular function and pelage color have different critical daylengths in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus sungorus*. *Endocrinology* 116: 424-30.
- Eibl-Eibesfeldt I (1953) Zur Ethologie des Hamsters (*Cricetus cricetus*). *Z Tierpsychol* 10: 204-254.
- Eichstädt S (2001a) Feldhamster statt Autos. In: HNA, 09.09.01, Kassel.
- Eichstädt S (2001b) Mercedes fängt Hamster. In: Mitteldeutsche Zeitung, 08.09.01, Halle.
- Eisentraut M (1928) Über die Baue und den Winterschlaf des Hamsters (*Cricetus cricetus* L.). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 3: 172-208.

- Elliott JA (1981) Circadian rhythms, entrainment and photoperiodism in the Syrian hamster. In *Biological clocks in seasonal reproductive cycles*, BK Follett and DE Follett, eds, pp 203-17. Wright, Bristol.
- Elliott JA, Stetson MH and Menaker M (1972) Regulation of testis function in golden hamsters: a circadian clock measures photoperiodic time. *Science* 178: 771-3.
- Elliott JA and Tamarkin L (1994) Complex circadian regulation of pineal melatonin and wheel-running in Syrian hamsters. *J Comp Physiol A* 174: 469-484.
- Ernst H, Kunstyr I, Rittinghausen S and Mohr U (1989) Spontaneous tumours of the European hamster (*Cricetus cricetus* L.). *Z Versuchstierkd* 32: 87-96.
- Garidou ML, Vivien-Roels B, Pevet P, Miguez J and Simonneaux V (2003) Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1043-52.
- Gaston S and Menaker M (1967) Photoperiodic control of hamster testis. *Science* 158: 925-928.
- Gattermann R (1985) Zur Biorhythmik des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus* Waterhouse 1839) IV. Annuale Rhythmen. *Zool Jahrb Physiol* 89: 279-285.
- Gauer F, Masson-Pévet M and Pévet P (1994a) Seasonal regulation of melatonin receptors in rodent pars tuberalis: correlation with reproductive state. *J Neural Transm* 96: 187-195.
- Ghadially FN and Illman O (1965) Naturally occurring thymomas in the European hamster. *J Pathol Bacteriol* 90: 465-9.
- Gillette M (1991) SCN electrophysiology in vitro: Rhythmic activity and endogenous clock properties. In *Suprachiasmatic nucleus - The mind's clock*, DC Klein, RY Moore and SM Reppert, eds, pp 125-143. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Gillies P (2002) Die Hamster, der Hohn und der Zorn der Frau Höhn. In: Die Welt (überregional), 21.03.02, Hamburg.
- Goldman BD (2000) The Siberian hamster as a model for study of the mammalian photoperiodic mechanism. In *Melatonin after four decades - an assessment of its potential*, J Olcese, ed, pp 155-164. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- Goldman BD (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16: 283-301.
- Goldschmitt W (2002) Spatenstich für die Arena. In: Stuttgarter Nachrichten, 07.12.02, Stuttgart.

- Górecki A and Grygielska M (1975) Consumption and utilization of natural foods by the common hamster. *Acta Theriol* 20: 237-246.
- Gorman MR, Freeman DA and Zucker I (1997) Photoperiodism in hamsters: Abrupt versus gradual changes in day length differentially entrain morning and evening circadian oscillators. *J Biol Rhythms* 12: 122-135.
- Gorman MR, Goldman BD and Zucker I (2001) Mammalian Photoperiodism. In *Handbook of Behavioral Neurobiology (Vol. 12): Circadian Clocks*, JS Takahashi, FW Turek and RY Moore, eds, pp 481-508, Vol. 12, Handbook of Behavioral Neurobiology. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Goss RJ (1984) Photoperiodic control of antler cycles in deer. I. Phase shift and frequency changes. *J Exp Zool* 170: 311-324.
- Grizmek B (1967) Die Kleinhohrigel, Grizmeks Tierleben, Vol. 10, Säugetiere, 1. Band, Kindler Verlag, Zürich.
- Grulich I (1981) Die Baue des Hamsters (*Cricetus cricetus*, Rodentia, Mammalia). *Folia Zool* 30: 99-116.
- Gubbels REMB, van Gelder JJ and Lenders A (1989) Thermotelemetric study on the hibernation of a common hamster, *Cricetus cricetus* (Linnaeus, 1758), under natural circumstances. In *Bijdragen tot de Dierkunde*, pp 27-31, Vol. 59.
- Guerin MV and Matthews CD (1998) Alterations of estrous activity in the ewe by circadian-based manipulation of the endogenous pacemaker. *J Biol Rhythms* 13: 60-69.
- Gwinner E (1986) Circannual Rhythms, Zoophysiology, Vol. 18, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- Gwinner E and Brandstätter R (2001) Complex bird clocks. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 356: 1801-1810.
- Harberey P, Canguilhem B and Kayser C (1967) Evolution saisonnière de l'élimination urinaire du sodium et du potassium chez le Hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*). In *Société de Biologie de Strasbourg*, pp 2044-2049.
- Hastings MH, Herbert J, Martensz ND and Roberts AC (1985) Annual reproductive rhythms in mammals: mechanisms of light synchronization. In *The Medical and Biological Effects of Light*, RJ Wurtman, MJ Baum and OT Potts, Jr., eds, pp 182-204, Vol. 453, Annals of the New York Academy of Sciences USA.
- Hastings MH, Mead SM, Vindlacheruv RR, Ebling FJP, Maywood ES and Grosse J (1992) Non-photoc phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res* 591: 20-26.
- Hastings MH, Walker AP and Herbert J (1987) Effect of asymmetrical reductions of photoperiod on pineal melatonin, locomotor activity and gonadal condition of male Syrian hamsters. *J Endocrinol* 114: 221-229.

- Hiebert SM, Thomas EM, Lee TM, Pelz KM, Yellon SM and Zucker I (2000) Photic entrainment of circannual rhythms in golden-mantled ground squirrels: Role of the pineal gland. *J Biol Rhythms* 15: 126-134.
- Hoffmann K (1973) The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight, and pelage colour in the Djungarian Hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol* 85: 267-282.
- Hoffmann K (1978) Photoperiodic Mechanism in Hamster: the Participation of the Pineal Gland. In *Environmental Endocrinology*, I Assenmacher and DS Farner, eds, pp 94-102. Springer Verlag, Berlin.
- Hoffmann K (1979) Photoperiodic effects in the Djungarian hamster: one minute of light during darktime mimics influence of long photoperiods on testicular recrudescence, body weight and pelage colour. *Experientia* 35: 1529-30.
- Hoffmann K (1982) The critical photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. In *Vertebrate Circadian Systems*, J Aschoff, S Daan and GA Groos, eds, pp 297-304. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hoffmann K and Illnerova H (1986) Photoperiodic effects in the Djungarian hamster. Rate of testicular regression and extension of pineal melatonin pattern depend on the way of change from long to short photoperiods. *Neuroendocrinology* 43: 317-21.
- Hoffmann K and Kuderling I (1975) Pinealectomy inhibits stimulation of testicular development by long photoperiods in a hamster (*Phodopus sungorus*). *Experientia* 31: 122-3.
- Honnigfort B (2002) Abgebrannte Hamster. In: Frankfurter Rundschau, 27.08.02, Frankfurt.
- Honrado GI and Fleming AS (1996) Chemical and behavioral stimulation from females accelerates recrudescence in male Syrian hamsters exposed to short days. *J Biol Rhythms* 11: 103-112.
- Hoogenboom I, Daan S, Dallingia JH and Schoenmakers M (1984) Seasonal change in the daily timing of behaviour of the common vole, *Microtus arvalis*. In *Oecologia*, pp 18-31, Vol. 61.
- Hotz Vitaterna M, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS and Sancar A (1999) Differential regulation of mammalian *Period* genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *PNAS* 96: 12114-12119.
- Hudson R and Distel H (1989) Temporal pattern of suckling in rabbit pups: a model of circadian synchrony between mother and young. In *Development of circadian rhythmicity and photoperiodism in mammals*, SM Reppert, ed, pp 83-102, Vol. IX. Perinatology Press, Ithaca, NY.
- Hut RA (2001) Natural entrainment of circadian systems - a study in the diurnal ground squirrel *Spermophilus citellus*. Thesis; Zoological Laboratory, Biological Center, University of Groningen, Haren.

- Illnerová H (1991) The suprachiasmatic nucleus and rhythmic pineal melatonin production. In *Suprachiasmatic nucleus - The mind's clock*, DC Klein, RY Moore and SM Reppert, eds, pp 197-216. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Illnerová H, Hoffmann K and Vanecek J (1984) Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 38: 226-31.
- Illnerová H and Vanecek J (1982) Two-oscillator structure of the pacemaker controlling the circadian rhythm of N-acetyltransferase in the rat pineal gland. *J Comp Physiol A* 145: 539-548.
- Ingenrieth A (2001) Pro Avantis, Hamster inklusive. In: *Aachener Nachrichten*, 17.10.01, Aachen.
- Inouye S-IT and Kawamura H (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5962-5966.
- Jagota A, De la Iglesia HO and Schwartz WJ (2000) Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *Nat Neurosci* 3: 372-376.
- Janik D, Godfrey M and Mrosovsky N (1994) Phase angle changes of photically entrained circadian rhythms following a single nonphotic stimulus. *Physiol Behav* 55: 103-107.
- Jansen U (2002) Entweder wir bauen die Halle im Bösfeld oder gar nicht. In: *Die Rheinlandpfalz*, 27.06.02, Ludwigshafen.
- Jelinková D, Illnerová H and Sumová A (2000) Gate for photic resetting of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus under a long photoperiod. *Neurosci Lett* 280: 143-6.
- Johnson RF, Moore RY and Morin LP (1988) Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res* 460: 297-313.
- Jonscher N (2001a) Bis zu 1000 Mark "Hamsterzulage" pro Haus. In: *Braunschweiger Zeitung*, 15.11.01, Braunschweig.
- Jonscher N (2001b) Die Rache der Hamster. In: *Braunschweiger Zeitung*, 03.11.01, Braunschweig.
- Jonscher N (2001c) Stadt: Hamster stoppen Baugebiet nicht. In: *Braunschweiger Zeitung*, 31.10.01, Braunschweig.
- Jonscher N (2003a) 20 Hamsterpaare ins Lammer "Exil" verbannt. In: *Braunschweiger Zeitung*, 08.02.03, Braunschweig.
- Jonscher N (2003b) Neues Zuhause für Feldhamster kostet 64000 Euro. In: *Braunschweiger Zeitung*, 08.02.03, Braunschweig.

- Jordan M (2001) Reintroduction and restocking programmes for the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) - issues and protocols. In: Internationaler Arbeitskreis Feldhamster, Vol. 122. Jahrbücher des Nassauischen Vereins für Naturkunde, Bacharach, p. 167-177.
- Jüttner P (1957) Hamsterschäden und Hamsterbekämpfung. Die Deutsche Landwirtschaft 8: 201-202.
- Karaseva EV (1962) A study of the peculiarities of territory utilization by the hamster in the Altai territory carried out with the use of labelling. Zoologiceskij zurnal 41: 275-285.
- Kaup F-J, Kunstyr I and Drommer W (1990) Characteristic of spontaneous intraperitoneal cysts in Golden hamsters and European hamsters. Exp Path 40: 205-212.
- Kayser A and Stubbe M (2000) Colour variation in the common hamster *Cricetus cricetus* in the north-eastern foot-hills of the Harz Mountains. Acta Theriol 45: 377-383.
- Kayser A and Stubbe M (2002) Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Bewirtschaftung auf den Feldhamster *Cricetus cricetus* (L.) einer Leit- und Charakterart der Magdeburger Börde. In: Ministerium für Raumordnung, Landwirtschaft und Umwelt, Halle.
- Kayser A, Voigt F and Stubbe M (2001) First Results on the Concentrations of Some Persistent Organochlorines in the Common Hamster *Cricetus cricetus* (L.) in Saxony-Anhalt. Bull Environ Contam Toxicol 67: 712-720.
- Kayser A, Voigt F and Stubbe M (2003) Metal concentrations in tissues of common hamsters (*Cricetus cricetus* [L.]) from an agricultural area in Germany. Bull Environ Contam Toxicol 70: 509-12.
- Kempf E, Mack G, Canguilhem B and Mandel P (1978) Seasonal changes in the levels and the turnover of brain serotonin and noradrenalin in the European hamster kept under constant environment. In *Experientia*, pp 1032-1033, Vol. 34.
- King DP and Takahashi JS (2000) Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. Annu Rev Neurosci 23: 713-742.
- Kirn N, Monecke S and Wollnik F (2002) Growth and reproductive development of European hamsters are affected by postnatal photoperiod. Zoology 105, Suppl. V (95. Annual Meeting of the Deutsche Zoologische Gesellschaft, Halle (Saale), Abstracts): 87.
- Kirn N and Wollnik F (2003) Growth and reproductive development of juvenile European hamsters (*Cricetus cricetus*). In: 54. Mosbach Kolloquium: The rhythm of life: molecular mechanisms of circadian clocks. Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Mosbach.
- Kirsch R, Belgnaoui S, Gourmelen S and Pévet P (1993) Daily melatonin infusion entrains free-running activity in Syrian and Siberian hamsters. In *Light and Biological Rhythms in Man*, L Wetterberg, ed, pp 107-120. Pergamon Press, Oxford.

- Klante G, Secci K, Masson-Pévet M, Pévet P, Vivien-Roels B, Steinlechner S and Wollnik F (1999) Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 45: R1078-R1086.
- Klein DC (1993) The mammalian melatonin rhythm generating system. In *Light and biological rhythms in man*, L Wetterberg, ed, pp 55-71. Pergamon Press, Oxford.
- Klein DC, Moore RY and Reppert SM (1991) *Suprachiasmatic nucleus - the mind's clock*, Oxford University Press, New York, Oxford.
- Kohler M (1998) Die Wirkung nicht-photischer Stimuli und die Rolle von Serotonin im circadianen System der Ratte. Dissertation; Biologisches Institut, Abteilung Tierphysiologie, Universität Stuttgart.
- Kopin IJ (1961) The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 236: 3072-3075.
- Körner C (2001) 140 Hamster haben ein neues Feld. In: *Bild*, 24.09.01, Leipzig.
- Kornhauser JM, Mayo LE and Takahashi JS (1996) Light, immediate-early genes, and circadian rhythms. *Behav Genet* 26: 221-240.
- Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE and Takahashi JS (1990) Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 5: 127-34.
- Krsmanovic L, Mikes M, Habijan V and Mikes B (1984) Reproductive activity of *Cricetus cricetus* L. in Vojvodina-Yugoslavia. *Acta Zoologica Fennica* 171: 173-174.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin XW, Maywood ES, Hastings MH and Reppert SM (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98: 193-205.
- Lange E (2002) Holland hat ein Herz für Hamster. In: *Westdeutsche Zeitung*, 27.02.02, Mönchengladbach.
- Larkin JE, Jones J and Zucker I (2002) Temperature dependence of gonadal regression in Syrian hamsters exposed to short day lengths. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R744-R752.
- Leak RK, Card JP and Moore RY (1999) Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res* 819: 23-32.
- Lee TM, Carmichael MS and Zucker I (1986) Circannual variations in circadian rhythms of ground squirrels. *Am J Physiol* 86: R831-R836.
- Lee TM and Zucker I (1991) Suprachiasmatic nucleus and photic entrainment of circannual rhythms in ground squirrels. *J Biol Rhythms* 6: 315-330.
- Lee TM and Zucker I (1992) Estradiol phase-shifts circannual rhythms of golden-mantled Ground Squirrels. *Am J Physiol* 262: R1096-R1099.

- Lee TM and Zucker I (1995) Seasonal variations in circadian rhythms persist in gonadectomized golden-mantled ground squirrels. *J Biol Rhythms* 10: 188-195.
- Lehman MN, Bittman EL and Newman SW (1984) Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in neuroendocrine responses to daylength in the golden hamster. *Brain Res* 308: 25-32.
- Leirs H (2002) Conservation advices based on rodent pest biology: the case of the hamster. In: S Mercelis, A Kayser and G Verbeylen (Eds), 10th Meeting of the International Hamsterworkgroup. *Natuurpunt Studie, Tongeren*, p. 82-84.
- Leirs H, Stenseth NC, Nichols JD, Hines JE, Verhagen R and Verheyen W (1997) Stochastic seasonality and nonlinear density-dependent factors regulate population size in an African rodent. *Nature* 389: 176-80.
- Lerchl A (1995) Sustained response of pineal melatonin synthesis to a single one-minute light pulse during night in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Neurosci Lett* 198: 65-7.
- Lerchl A and Schlatt S (1993) Influence of photoperiod on pineal melatonin synthesis, fur color, body weight, and reproductive function in the female Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 57: 359-364.
- Malpoux B, Migaud M, Tricoire H and Chemineau P (2001) Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* 16: 336-47.
- Mammen K, Resetaritz A and Mammen U (2002) Management and development of a Common hamster population after translocation. In: S Mercelis, A Kayser and G Verbeylen (Eds), 10th Meeting of the International Hamster Workgroup, Tongeren (Belgium).
- Masson-Pévet M and Gauer F (1994) Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol Signals* 3: 63-70.
- Masson-Pévet M, George D, Kalsbeek A, Saboureau M, Lakhdar-Ghazal N and Pévet P (1994a) An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res* 278: 97-106.
- Masson-Pévet M, Naimi F, Canguilhem B, Saboureau M, Bonn D and Pévet P (1994b) Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (*Cricetus cricetus*) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J Pineal Res* 17: 151-163.
- Matthews CD, Seamark RF and Guerin MV (1992) Plasma melatonin profiles of Romney Marsh sheep in natural photoperiod and in acutely extended darkness. *J Reprod Fertil* 95: 869-75.
- Menaker M and Vogelbaum MA (1993) Mutant circadian period as a marker of suprachiasmatic nucleus function. *J Biol Rhythms* 8 Suppl: S93-8.

- Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG and Morgan PJ (2000) Photoperiod differentially regulates the expression of *Per1* and *ICER* in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur J Neurosci* 12: 2865-70.
- Messenger S, Ross AW, Barrett P and Morgan PJ (1999) Decoding photoperiodic time through *Per1* and *ICER* gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9938-43.
- Michener GR (1992) Sexual differences in over-winter torpor patterns of Richardson's ground squirrels in natural hibernacula. *Oecologia* 89: 397-406.
- Mohr U, Schuller H, Reznik G, Althoff J and Page N (1973) Breeding of European hamsters. *Lab Anim Sci* 23: 799-802.
- Monecke S (2001) The two physiological identities of the Common Hamster (*Cricetus cricetus* L.) - A race against the time of year. In *Jahrbücher des Nassauischen Vereins für Naturkunde*, NVf Naturkunde, ed, pp 209-213, Vol. 122. Nassauischer Verein für Naturkunde, Wiesbaden.
- Monecke S, Lemuth K and Wollnik F (2001) Ontogeny of the melatonin rhythm in European hamsters (*Cricetus cricetus*). *Zoology* 104, Suppl. IV (94. Annual Meeting of the Deutsche Zoologische Gesellschaft, Osnabrück, Abstracts): 63.
- Monecke S and Wollnik F (2004) European hamsters (*Cricetus cricetus*) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression. *Biol Reprod*: in press.
- Monecke S and Wollnik F (in prep.) Seasonal variations in circadian rhythms characterize a phase of sensitivity to short photoperiods in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *J Comp Physiol [B]*: in preparation.
- Moore RY (1996) Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 73: 125-30.
- Moore RY and Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42: 201-6.
- Moore RY and Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146: 1-14.
- Morgan PJ, Messenger S, Webster C, Barrett P and Ross A (2000) How does the melatonin receptor decode a photoperiodic signal in the pars tuberalis? In *Melatonin after four decades - an assessment of its potential*, J Olcese, ed, pp 165-174. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- Mrosovsky N, Boshes M, Hallonquist JD and Lang K (1976) Circannual cycle of circadian cycles in a golden-mantled ground squirrel. *Naturwissenschaften* 63: 298-9.
- Mrugala M, Zlomanczuk P, Jagota A and Schwartz WJ (2000) Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R987-R994.

- Müller K (1978) The flexibility of the circadian system of fish at different latitudes. In *Rhythmic activity of fishes*, JE Thorpe, ed, pp 91-104. A subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, London, New York, San Francisco.
- Muschketat LF and Klamroth B (1990) Vorarbeiten zur Erfassung des Vorkommens des Feldhamsters (*Cricetus cricetus*) und des Maulwurfs (*Talpa Europaea*). In: *Ecosystem*, 11/1990, Bad Rappenau.
- Nechay G (2000) Status of hamsters *Cricetus cricetus*, *Cricetus migratorius*, *Mesocricetus Newtoni* and other hamster species in Europe, *Nature and environment*, Vol. 106, Council of Europe, Strasbourg Cedex.
- Nechay G, Hamar M and Grulich L (1977) The Common Hamster [*Cricetus cricetus* (L.)]; a Review. *EPPO Bulletin* 7: 255-276.
- Nelson RJ (1995) Biological Rhythms and Behavior. In *An Introduction to Behavioral Endocrinology*, RJ Nelson, ed, pp 381-442, Sunderland, Massachusetts.
- Newman G (1991) SCN metabolic activity in vitro. In *Suprachiasmatic nucleus - The mind's clock*, DC Klein, RY Moore and SM Reppert, eds, pp 157-176. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Niethammer J (1982) *Cricetus cricetus* (Linnaeus, 1758) - Hamster (Feldhamster). In *Handbuch der Säugetiere Europas*, J Niethammer and F Krapp, eds, pp 7-28, Vol. 2/1 Rodentia II. Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden.
- Nowak R, McMillen IC, Redman J and Short RV (1987) The correlation between serum and salivary melatonin concentrations and urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion rates: two non-invasive techniques for monitoring human circadian rhythmicity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 27: 445-52.
- Nuesslein-Hildesheim B, O'Brien JA, Ebling JP, Maywood ES and Hastings MH (2000) The circadian cycle of mPER clock gene products in the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster encodes both daily and seasonal time. *Eur J Neurosci* 12: 2856-2864.
- Panda S, Hogenesch JB and Kay SA (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417: 329-35.
- Pengelley ET (1974) Circannual Rhythmicity in Hibernating Mammals. In *Circannual clocks - annual biological rhythms*, ET Pengelley, ed, pp 95-160, New York, San Francisco, London.
- Petzsch H (1936) Beiträge zur Biologie, insbesondere Fortpflanzungsbiologie des Hamsters. In *Monographien der Wildsäugetiere 1*, pp 9-83, Vol. 12, Z Kleintierkd Pelztierkd.
- Petzsch H (1952) Der Hamster, Die Neue Brehm-Bücherei, Vol. 21, Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig KG, Leipzig.

- Pévet P (2003) Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol* 15: 422-6.
- Pévet P, Pitrosky B, Vuillez P, Jacob N, Teclemariam-Mesbah R, Kirsch R, Vivien-Roels B, Lakhdar-Ghazal N, Canguilhem B and Masson-Pévet M (1996) The suprachiasmatic nucleus: the biological clock of all seasons. *Prog Brain Res* 111: 369-84.
- Pickard GE, Ralph MR and Menaker M (1987) The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 2: 35-56.
- Pitrosky B, Kirsch R, Vivien-Roels B, Georg-Bentz I, Canguilhem B and Pevet P (1995) The photoperiodic response in Syrian hamster depends upon a melatonin-driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol* 7: 889-895.
- Pitrosky B and Pévet P (1997) The photoperiodic response in Syrian hamsters depends upon a melatonin-driven rhythm of sensitivity to melatonin. *Biol Signals* 6: 264-271.
- Pittendrigh CS and Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: Pacemaker as a clock. *J Comp Physiol A* 106: 291-331.
- Pittendrigh CS and Daan S (1976a) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J Comp Physiol A* 106: 223-252.
- Pittendrigh CS and Daan S (1976b) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *J Comp Physiol A* 106: 333-355.
- Pittendrigh CS and Minis DH (1964) The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *The American Naturalist* 98: 261-294.
- Pohl H (1987) Circadian pacemaker does not arrest in deep hibernation. Evidence for desynchronization from the light cycle. *Experientia* 43: 293-4.
- Potocki L, Glaze D, Tan DX, Park SS, Kashork CD, Shaffer LG, Reiter RJ and Lupski JR (2000) Circadian rhythm abnormalities of melatonin in Smith-Magenis syndrome. *J Med Genet* 37: 428-433.
- Puchalski W and Lynch GR (1986) Evidence for differences in the circadian organization of hamsters exposed to short day conditions. *J Comp Physiol [A]* 159: 7-11.
- Puchalski W and Lynch GR (1991) Circadian characteristics of Djungarian hamsters: effects of photoperiodic pretreatment and artificial selection. *Am J Physiol* 261: R670-R676.
- Rajaratnam SMW and Redman JR (1999) Social contact synchronizes free-running activity rhythms of diurnal palm squirrels. *Physiol Behav* 66: 21-26.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC and Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-8.

- Redman J, Armstrong S and Ng KT (1983) Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin. *Science* 219: 1089-1091.
- Reiter RJ (1969) Pineal function in long term blinded male and female golden hamsters. *Gen Comp Endocrinol* 12: 460-468.
- Reiter RJ (1972) Evidence for refractoriness of the pituitary-gonadal axis to the pineal gland in golden hamsters and its possible implications in annual reproductive rhythms. *Anat Rec* 173: 365-71.
- Reiter RJ (1986) Pineal melatonin production: photoperiodic and hormonal influences. In *Advances in pineal research: 1*, RJ Reiter and M Karasek, eds, pp 77-87. John Libbey & Co Ltd.
- Reiter RJ (1987) The melatonin message: duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci* 40: 2119-31.
- Reiter RJ (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-64.
- Ribelayga C, Pevet P and Simonneaux V (2000) HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1339-45.
- Ribelayga C, Pévet P and Simonneaux V (1998) Possible involvement of neuropeptide Y in the seasonal control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Brain Res* 777: 247-250.
- Ruby NF, Dark J, Heller HC and Zucker I (1996) Ablation of suprachiasmatic nucleus alters timing of hibernation in ground squirrels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9864-8.
- Rusak B (1977) The role of the suprachiasmatic nuclei in the generation of circadian rhythms in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J Comp Physiol* 118: 145-164.
- Rusak B and Morin LP (1976) Testicular responses to photoperiod are blocked by lesions of the suprachiasmatic nuclei in golden hamsters. *Biol Reprod* 15: 366-74.
- Ruzic A (1976) Some peculiarities in the hibernation of the hamster (*Cricetus cricetus*) and their importance for the control of that pest. *Zastita bilja (Beograd)* 27: 397-417.
- Saboureau M, Masson-Pévet M, Canguilhem B and Pévet P (1999) Circannual reproductive rhythm in the European hamster (*Cricetus cricetus*): Demonstration of the existence of an annual phase of sensitivity to short photoperiod. *J Pineal Res* 26: 9-16.
- Schneider E (1968) *Freude am Meerschweinchen*, Vol. 353, The pet library ltd.
- Schuhler S, Pitrosky B, Kirsch R and Pévet P (2002) Entrainment of locomotor activity rhythm in pinealectomized adult Syrian hamsters by daily melatonin infusion. *Behav Brain Res* 133: 343-350.

- Schwartz WJ (1991) SCN metabolic activity in vivo. In *Suprachiasmatic nucleus - The mind's clock*, DC Klein, RY Moore and SM Reppert, eds, pp 144-156. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Schwartz WJ, de la Iglesia HO, Zlomanczuk P and Illnerová H (2001) Encoding le quattro stagioni within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 16: 302-11.
- Simonneaux V and Ribelayga C (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55: 325-95.
- Steinlechner S (1992) Melatonin: an endocrine signal for the night length. *Verh Dtsch Zool Ges* 85: 217-229.
- Steinlechner S, Buchberger A and Heldmaier G (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: 593-597.
- Steinlechner S, Jacobmeier B, Scherbarth F, Dernbach H, Kruse F and Albrecht U (2002) 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: 202-9.
- Stephan FK and Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1583-1586.
- Stetson MH, Ray SL, Creyau Miller N and Horton TH (1989) Maternal transfer of photoperiodic information in siberian hamsters 2. the nature of the maternal signal, time of signal transfer, and the effect of the maternal signal on peripubertal reproductive development in the absence of photoperiodic input. *Biol Reprod* 40: 458-465.
- Stetson MH and Watson-Whitmyre M (1984) Physiology of the pineal and its hormone melatonin in annual reproduction in rodents. In *The Pineal Gland*, RJ Reiter, ed, pp 109-153. Raven Press, New York.
- Stetson MH, Watson-Whitmyre M and Matt KS (1977) Termination of photorefractoriness in golden hamsters - photoperiodic requirements. *J Exp Zool* 202: 81-88.
- Stieglitz A, Spiegelhalter F, Klante G and Heldmaier G (1995) Urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion reflects pineal melatonin secretion in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Pineal Res* 18: 69-76.
- Stricker S (1999) Ein Beitrag zur tiergerechten Haltung des Hamsters anhand der Literatur. Inaugural Dissertation Dr. vet. med.; Institut für Tierhygiene und Tierschutz, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Sulzer FG (1774) Versuch einer Naturgeschichte des Hamsters. 2. Neuauflage von H Petzsch (1949), Verlag Naturkunde, Hannover, Berlin-Zehlendorf.

- Sumová A and Illnerová H (1996) Melatonin instantaneously resets intrinsic circadian rhythmicity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 218: 181-4.
- Sumová A and Illnerová H (1998) Photic resetting of intrinsic rhythmicity of the rat suprachiasmatic nucleus under various photoperiods. *Am J Physiol* 274: R857-63.
- Sumová A, Jac M, Sládek M, Sauman I and Illnerová H (2003) Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J Biol Rhythms* 18: 134-44.
- Sumová A, Sládek M, Jác M and Illnerová H (2002) The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. *Brain Res* 947: 260-70.
- Sumová A, Trávníčková Z, Peters R, Schwartz W and Illnerová H (1995) The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7754-7758.
- Takahashi JS (1993) Circadian-clock regulation of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3: 301-309.
- Tangl M (2002a) Feldhamster im Bösfeld halten Arena-Planer auf Trab. In: *Mannheimer Morgen*, 09.11.02, Mannheim.
- Tangl M (2002b) Teure Hamster. In: *Mannheimer Morgen*, 09.11.02, Mannheim.
- Tournier BB, Menet JS, Dardente H, Poirel VJ, Malan A, Masson-Pévet M, Pévet P and Vuillez P (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* 118: 317-22.
- Travníková Z, Sumová A, Peters R, Schwartz WJ and Illnerová H (1996) Photoperiod-dependent correlation between light-induced SCN c-fos expression and resetting of circadian phase. *Am J Physiol* 271: R825-31.
- Turek FW and Campbell CS (1979) Photoperiodic regulation of neuroendocrine-gonadal activity. *Biol Reprod* 20: 32-50.
- Turek FW and Van Cauter E (1994) Rhythms in Reproduction. In *The Physiology of Reproduction*, E Knobil and JD Neill, eds, pp 487-540. Raven Press, Ltd., New York.
- Vivien-Roels B, Pévet P, Masson-Pévet M and Canguilhem B (1992) Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the European hamster. *Gen Comp Endocrinol* 86: 239-247.

- Vivien-Roels B, Pitrosky B, Zitouni M, Malan A, Canguilhem B, Bonn D and Pevét P (1998) Photoperiodic control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Ann N Y Acad Sci* 839: 386-388.
- Vivien-Roels B, Pitrosky B, Zitouni M, Malan A, Canguilhem B, Bonn D and Pévet P (1997) Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 106: 85-94.
- Vohralik V (1974) Biology of the reproduction of the common hamster, *Cricetus cricetus*. *Vestnik Československe Spolecnosti Zoologicke* 38: 288-240.
- Vohralik V (1975) Postnatal development of the common hamster *Cricetus cricetus* (L.) in captivity, *Academia Nakladatelstvi Československé Akademie Ved, Praha*.
- Vuillez P, Jacob N, Tecler-Mesbah R and Pévet P (1996) In Syrian and European hamsters, the duration of sensitive phase to light of the suprachiasmatic nuclei depends on the photoperiod. *Neurosci Lett* 208: 37-40.
- Wager-Smith K and Kay SA (2000) Circadian rhythm genetics: from flies to mice to humans. *Nature Genet* 26: 23-27.
- Waßmer T and Wollnik F (1997) Timing of torpor bouts during hibernation in European hamsters (*Cricetus cricetus* L.). *J Comp Physiol [B]* 167: 270-279.
- Watts A (1991) The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. In *Suprachiasmatic nucleus - The mind's clock*, DC Klein, RY Moore and SM Reppert, eds, pp 77-106. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Wehr TA, Moul DE, Barbato G, Giesen HA, Seidel JA, Barker C and Bender C (1993) Conservation of photoperiod-responsive mechanisms in humans. *Am J Physiol* 265: R846-R857.
- Wendt W (1989) Zum Aktivitätsverhalten des Feldhamsters, *Cricetus cricetus* L., im Freigehege. *Säugetierkd Inf* 3: 3-12.
- Wendt W (1990) Zum Aktivitätsverhalten des Feldhamsters in rechteckförmigen Licht-Dunkel-Regimen, *Cricetus cricetus* L. *Säugetierkd Inf* 3: 155-167.
- Witte BF (2001) Die Hamster endlich vom Eis nehmen. In: *Süddeutsche Zeitung*, 24.10.01, überregional.
- Wollnik F, Breit A and Reinke D (1991) Seasonal change in the temporal organization of wheel-running activity in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Naturwissenschaften* 78: 419-422.

- Wollnik F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon F, Bravo R, Zimmermann M, Schlingensiepen KH and Herdegen T (1995) Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci* 7: 388-93.
- Wollnik F and Schmidt B (1995) Seasonal and daily rhythms of body temperature in the European hamster (*Cricetus cricetus*) under semi-natural conditions. *J Comp Physiol [B]* 165: 171-82.
- Woodfill CJI, Robinson JE, Malpoux B and Karsch FJ (1991) Synchronization of the circannual reproductive rhythm of the ewe by discrete photoperiodic signals. *Biol Reprod* 45: 110-121.
- Woodfill CJI, Wayne NL, Moenter SM and Karsch FJ (1994) Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: Identification of season-specific time cues. *Biol Reprod* 50: 965-976.
- Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC and Bradley A (1999) The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400: 169-73.
- Zheng BH, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu WQ, Vaishnav S, Li Q, Sun ZS, Eichele G, Bradley A and Lee CC (2001) Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105: 683-694.
- Zucker I (1979) Hormones and hamster circadian organization (Review). In *Biological Rhythms and their Central Mechanisms*, M Suda, O Hayaishi and H Nakagawa, eds, pp 369-381. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Zucker I (2001) Circannual Rhythms - Mammals. In *Handbook of Behavioral Neurobiology*, JS Takahashi, FW Turek and RY Moore, eds, pp 509-528, Vol. 12, Circadian Clocks. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- Zucker I, Boshes M and Dark J (1983) Suprachiasmatic nuclei influence circannual and circadian rhythms of ground squirrels. *Am J Physiol* 244: R472-80.

6

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die vielfältige Hilfe und Unterstützung zahlreicher Freunde und Kollegen nicht möglich gewesen. Sie alle namentlich aufzuzählen, würde allerdings den Rahmen sprengen. Dennoch möchte ich einige besonders hervorheben.

An erster Stelle steht der Dank an meine Doktormutter Prof. Dr. Franziska Wollnik, die die Mittel für diese kostenintensive Studie eingeworben und mich für dieses äußerst spannende und vielseitige Thema begeistert hat. Dabei vertraute sie mir den gesamten - für eine Versuchstierhaltung außergewöhnlichen - Feldhamsterbestand an und ließ mir bei der Durchführung dieser Arbeit großzügige Freiräume für eigene Ideen. Ich möchte mich ganz besonders für ihre exzellente fachliche Betreuung, ihr persönliches Engagement und die viele Zeit bedanken, die sie mir und meiner Arbeit widmete. Ich konnte jederzeit auf ihre Hilfe und Unterstützung zählen. So wurden während Diskussionen viele gemeinsame Ideen entwickelt und laufende Experimente immer weiter verbessert. Dazu trug ebenfalls entscheidend bei, dass sie mir die Teilnahme an zahlreichen Tagungen ermöglichte.

Bei Prof. Dr. Wolfgang Hauber möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Angeline Votteler und Harald Feuchter waren mir bei der Versorgung der Hamster und den Versuchsdurchführungen eine unschätzbare, zuverlässige Hilfe. Zudem konnte ich mich immer darauf verlassen, dass Harald mich rechtzeitig an alle Urinsammeltermine erinnert. Ohne ihn hätte ich sicher die ein oder andere Sammlung vergessen.

Die drei Computerspezialisten Stefan Nitschke, Christian Giertler und Hagen Schmidt haben durch die vorbildliche Wartung und Pflege meiner Rechner sowohl eine zuverlässige Datenverarbeitung gewährleistet als auch eine mehrjährige, nahezu fehlerfreie

Aktivitätsregistrierung ermöglicht. Besonderer Dank gebührt dabei Stefan Nitschke, dessen tatkräftige Hilfe es mir erst gestattete, eine zweite Registrierungseinheit im Feldhamster-„Container“ einzurichten.

Birgit Amann und Judith Schweimer standen mir nicht nur bei Problemen in der Datenverarbeitung jederzeit hilfreich zur Seite, sondern brachten auch zusammen mit Karin Lemuth und Nicole Kirn durch manch konstruktive, nette Diskussion meine Arbeit voran.

Iris Davidsson hat mir glücklicherweise die zeit- und nervenaufreibenden, verwaltungstechnischen Arbeit, (ich sag nur Dienstreiseanträge und Reisekosten) abgenommen, wofür ich ihr herzlich danke.

Dr. Uwe Redlin, Agnès Dégardin, Susanne Weiß und Susanne Jacob haben verschiedene Teile meiner Arbeit sorgfältigst korrigiert: fiehlen, fiehlen Dank.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gebührt mein Dank für die Finanzierung dieser Arbeit (Wo 354/12-1).

Weiterhin danke ich dem Deutschen Wetterdienst Stuttgart, der mir immer pünktlich zum Jahresbeginn die exakten Daten zu Sonnenauf- und -untergang geliefert hat, auf denen ein bedeutender Teil meiner Auswertung beruht, und der Observer Argus Media GmbH, die mich während meiner gesamten Promotionszeit mit Zeitungsartikeln zum Thema Feldhamster aus dem gesamten Bundesgebiet versorgte.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden. Ihr positiver Zuspruch und ihre Unterstützung waren mir besonders im „Endspurt“ ein wertvoller Rückhalt. Mein ganz besonderer Dank gilt neben meiner Familie Petra Widmer für die erheiternden Stunden in unserem virtuellen Büro, die die Wochenenden und Abende vor dem Rechner nie zu einer Qual werden ließen und insbesondere Agnès Dégardin für ihre allumfassende Unterstützung, besonders für ein erstklassiges „Catering“ in der Endphase dieser Arbeit.

Lebenslauf

zur Person

Stefanie Monecke
geboren am 15.11.1970 in Bramsche

Schulbildung

1977 – 1990	Grundschule und Orientierungsstufe Gartenstadt, Bramsche; Gymnasium Bramsche
1990	Abitur

Hochschulstudium

1990 - 1991	Studiengang Forstwissenschaften Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
1991 - 1998	Studiengang Biologie und Chemie (Lehramt an Gymnasien) Gesamthochschule Kassel und Universität Hannover
1998	1. Staatsexamen
2000 - 2003	Promotion an der Universität Stuttgart im Fach Biologie