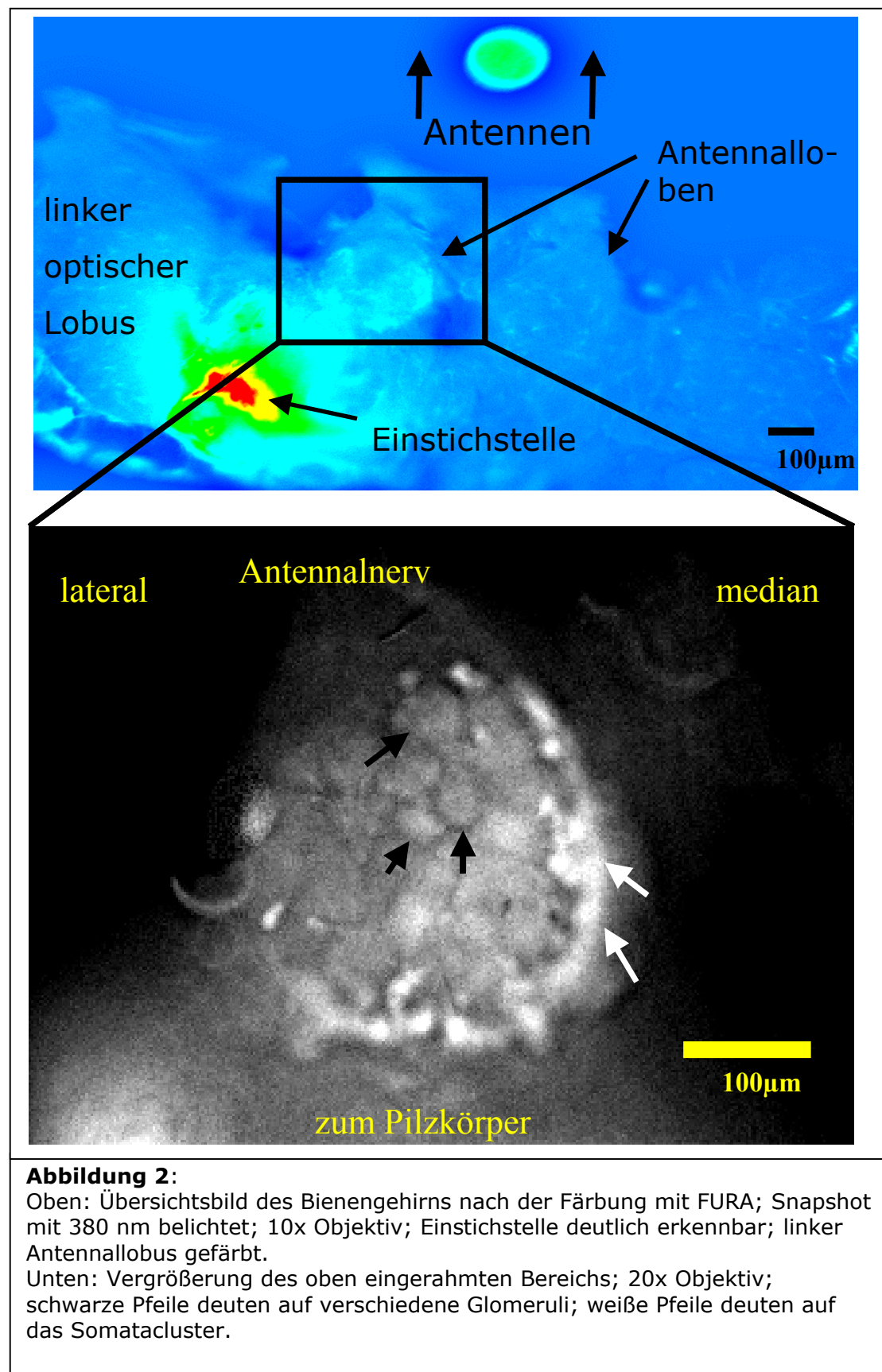


2.1. Material und Methoden der Sensibilisierungsexperimente

Alle verwendeten Bienen (*Apis mellifera carnica*-Sammlerinnen) wurden aus institutseigenen Stöcken bezogen. In den Wintermonaten (ab Oktober bis März) wurden sie in einem klimatisierten Flugraum gefangen. Alle Tiere wurden vormittags. Tiere, die aus dem Flugraum gefangen wurden, wurden direkt in ein Gläschen gefangen. Bienen aus freistehenden Stöcken wurden mit Hilfe einer Plexiglaspyramide beim Ausfliegen am Stockein- bzw. ausgang weggefangen. Aus der Pyramide wurde sie dann in ein Gläschen überführt. Die Gläschen wurden dann für ca. 10 Minuten auf Eis gelegt, wodurch die Bienen bewegungsunfähig wurden. So konnten sie daraufhin in die Ableitkammern überführt werden. Für das Verhaltensexperiment wurden die Tiere in kleinen Röhrchen fixiert. Zur weiteren Fixierung in den Ableitkammern wurde Zahnwachs verwendet, der die Biene am Kopf und am Thorax mit der Ableitkammer verband. Daraufhin wurde mit einer abgebrochenen Rasierklinge ein kleines Fenster in die Kopfkapsel geschnitten, um Zugang zur Einstichstelle für die Färbung zu ermöglichen. Tracheen und Drüsengewebe wurden vorsichtig entfernt. Die Spitze einer Glaselektrode wurde nun mit FURA-Dextran-Kristallen (Kaliumsalz, 3000 bzw. 10000 MW, Molecular Probes, Eugene, USA) beschichtet. Das FURA-Dextran war in 2%igem Albumin gelöst. Mit der derart beladenen Elektrode wurde jetzt in das linke Deuteroerebrum neben dem α -Lobus bzw. leicht unterhalb des Pilzkörpers gestochen (siehe Abbildung 2), mit dem Ziel den IACT zu treffen. Daraufhin wurde das Gehirn mit Ringer (130mM NaCl, 6mM KCl, 4mM MgCl₂, 5mM CaCl₂, 160mM Zucker, 25mM Glukose, 10mM HEPES, pH 6.7, 500mOsmol; alle Chemikalien von Sigma) gespült, um extrazellulär verbliebenen

Farbstoff zu entfernen. Die Tiere wurden nach drei Stunden Färbung weiterverwendet.



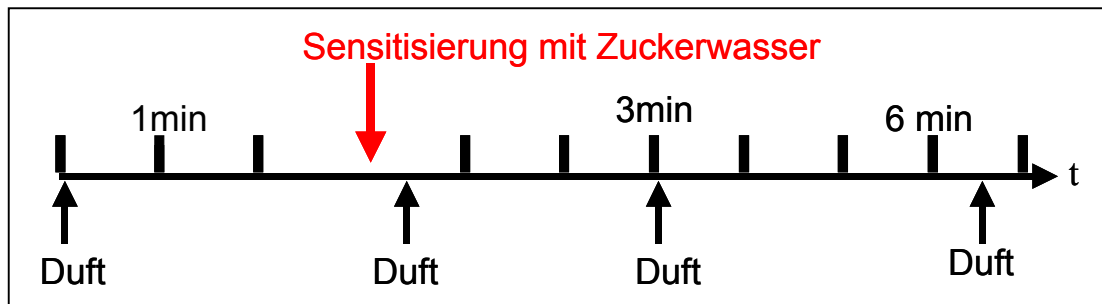
Für allen weiteren Präparationen wurde die Kopfkapsel von knapp unterhalb der Antennenbasis, seitlich bis zu den Augenrändern bis knapp oberhalb der Ocellen aufgeschnitten. Die Antennen wurden leicht nach vorne gehalten und in dieser Position am Scarpus am vorderen Teil des Kopfes mit Eicosan befestigt. Für die Sensitisierungsversuche wurde das Abdomen abgeschnitten, mit dem Ziel, das Gehirn während der Messung so ruhig wie möglich zu halten.

Der aufpräparierte Kopf wurde nun mit einem Deckgläschen verschlossen, das Gehirn wurde dabei jedoch ständig durch einen Ringerfluss überspült, um eine Austrocknung zu verhindern.

Kalzium-Messungen der PN

Das Imaging wurde mit dem T.I.L.L. Photonics ImagingSystem (Deutschland) durchgeführt. Die monochromatische Erregungswellenlänge wechselte zwischen 340 nm und 380 nm, dichroic: 410 nm; Emission: LP 440 nm. Die Messungen erfolgten mit einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop und 10x Luft- (für Übersichtsbilder, NA 0,3) bzw. 20x Wasserimmersions-Objektiven (NA 0,5). Die Pixelgröße betrug $1,96 \mu\text{m} \times 1,96 \mu\text{m}$, bei einem 2x2er Binning auf dem Chip der CCD-Kamera. Bei den Sensitisierungsexperimenten wurden 60 (10s) Doppelframes bei 6Hz aufgenommen. Die Duftpräsentation dauerte 4s. Der Duft wurde in einen konstanten Luftstrom eingeführt, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Die Duftorgel wurde computergesteuert. Die Düfte waren in Mineralöl (60% Dampfdruckangepasstes Duftöl/40% Mineralöl) gelöst. $4\mu\text{l}$ dieser Lösung wurden auf 1cm^2 Filterpapier gegeben, welches dann in die Spritzen der Duftorgel überführt wurden. Die Verdünnung wurde auf den gleichen effektiven Dampfdruck der Düfte angepasst. Die

verwendeten Düfte waren: 1Hexanol, 1Nonanol und Isoamylacetat. (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Das Protokoll für alle Messungen (Sens n=11; Kontr n=7) und das Verhaltensexperiment (Gruppe „neu“ im Ergebnisteil) (n=43) sah wie folgt aus:



Der Duft wurde 3min vor der eventuellen Sensibilisierung mit Zuckerwasser präsentiert und dann 30s, 3min und 6,5min danach erneut. Der Zuckerwasserstimulus dauerte 3 Sekunden.

Datenbearbeitung

Die Berechnungen zur Bestimmung der Kalziumkonzentrationen erfolgte mit IDL (Research Systems, CO). Die Kalziumkonzentrationen für jeden Frame berechnen sich im ersten Schritt aus der Fluoreszenzveränderung zwischen den beiden Erregungswellenlängen ($\Delta(F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}} = \text{Ratio})$). Aufgrund der starken Spontanaktivität der Projektionsneurone und der individuell verschiedenen Hintergrundfluoreszenz der einzelnen Glomeruli, wurde im nächsten Schritt eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Hierbei wurden von der Zeitspur Frames vor der Duftgabe abgezogen, wodurch alle Zeitspuren auf einen Wert um Null kurz vor Stimulusbeginn überlagert werden. Des Weiteren wurden die Ratios zur shot noise-Reduktion Median-gefiltert (Filtergröße 3 Pixel, zwei räumliche Dimensionen, eine zeitliche Dimension). Zur Ausbleichkorrektur wurde der Mittelwert jedes Frames vom Ratio

abgezogen. Die Veränderungen $\Delta(F340nm/F380nm)$ des FURA sind den Veränderungen des intrazellulären Kalziums in etwa proportional.

Die Identifizierung der Glomeruli erfolgte zum einen anhand der morphologischen Übersichtsbilder der Ratios, in denen die Grenzen zwischen den Glomeruli zum Teil sichtbar sind, zum anderen anhand der während des Stimulus erregten und somit sichtbar werdenden Glomeruli. Die Nummerierung basiert auf dem Antennallobus-Standardatlas für Projektionsneurone (Silke Sachse). Die Zeitspuren wurden für verschiedene Glomeruli wie folgt berechnet: In der Mitte eines Glomerulus wurde eine Region ausgewählt. Die Helligkeitswerte aller Pixel innerhalb dieser Region wurde gemittelt und über die Zeit aufgetragen. Für die Falschfarbenbilder wurde für jedes Pixel vom Maximum der ersten 3 Sekunden während des Stimulus der Mittelwert aus den drei unmittelbar vor dem Stimulus liegenden Frames abgezogen.

Jeweils der Hauptglomerulus laut Atlas wurde für die weitere Analyse verwendet. Konnte dieser nicht identifiziert werden, wurde auf den nächst stärkst erregten zurückgegriffen. Aus den Zeitspuren der verschiedenen Duftpräsentationen wurde das Maximum während des Stimulus ermittelt. Die Mittelwerte der Maxima der beiden Gruppen wurden jeweils auf den Mittelwert des ersten Maximums normiert. Der Vergleich zwischen den einzelnen Duftpräsentationen erfolgte mit einem ANOVA (STATISTICA-Software).

2.2. Material und Methoden der Spontanaktivitätsexperimente

Alle verwendeten Bienen (*Apis mellifera carnica*-Sammlerinnen) wurden aus institutseigenen Stöcken bezogen. In den Wintermonaten (ab Oktober bis März) wurden sie in einem klimatisierten Flugraum gefangen. Alle Tiere wurden vormittags gefangen. Tiere, die aus dem Flugraum gefangen wurden, wurden direkt in ein Gläschen gefangen. Bienen aus freistehenden Stöcken wurden mit Hilfe einer Plexiglaspyramide beim Ausfliegen am Stockein- bzw. ausgang weggefangen. Aus der Pyramide wurde sie dann in ein Gläschen überführt. Die Gläschen wurden dann für ca. 10 Minuten auf Eis gelegt, wodurch die Bienen bewegungsunfähig wurden. So konnten sie daraufhin in die Ableitkammern überführt werden. Zur weiteren Fixierung wurde Zahnwachs verwendet, der die Biene am Kopf und am Thorax mit der Ableitkammer verband. Daraufhin wurde mit einer abgebrochenen Rasierklinge ein kleines Fenster in die Kopfkapsel geschnitten, um Zugang zur Einstichstelle für die Färbung zu ermöglichen. Tracheen und Drüsengewebe wurden vorsichtig entfernt. Die Spitze einer Glaselektrode wurde nun mit FURA-Dextran-Kristallen (Kaliumsalz, 3000 bzw. 10000 MW, Molecular Probes, Eugene, USA) beschichtet. Das FURA-Dextran war in 2%igem Albumin gelöst. Mit der derart beladenen Elektrode wurde jetzt in das linke Deuteroerebrum neben dem α -Lobus bzw. leicht unterhalb des Pilzkörpers gestochen (siehe Abbildung 2), mit dem Ziel den IACT zu treffen. Daraufhin wurde das Gehirn mit Ringer (130mM NaCl, 6mM KCl, 4mM MgCl₂, 5mM CaCl₂, 160mM Zucker, 25mM Glukose, 10mM HEPES, pH 6.7, 500mOsmol; alle Chemikalien von Sigma) gespült, um extrazellulär verbliebenen Farbstoff zu entfernen. Die Tiere wurden nach drei Stunden Färbung weiterverwendet.

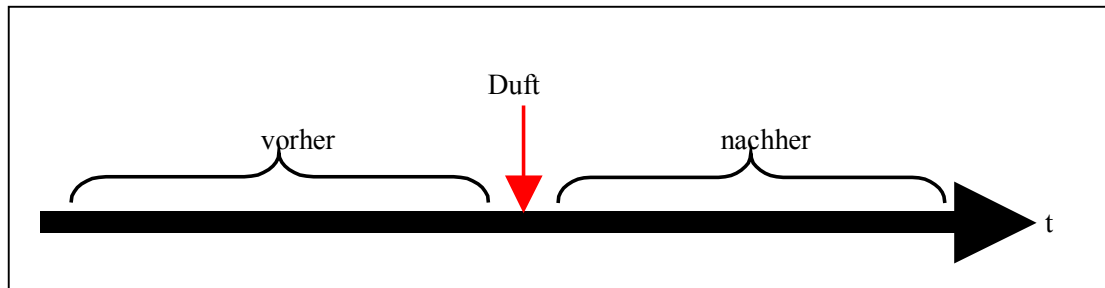
Für allen weiteren Präparationen wurde die Kopfkapsel von knapp unterhalb der Antennenbasis, seitlich bis zu den Augenrändern bis knapp oberhalb der Ocellen aufgeschnitten. Die Antennen wurden leicht nach vorne gehalten und in dieser Position am Scarpus am vorderen Teil des Kopfes mit Eicosan befestigt. Anfangs wurde Philanthotoxin 343 (in geringen Mengen) verwendet, mit dem Ziel, das Gehirn während der Messung so ruhig wie möglich zu halten. Allerdings konnte später der gleiche Effekt erzielt werden, in dem man das Abdomen an die Ableitkammer festwachste.

Der aufpräparierte Kopf und das darin befindliche Gehirn war durch den Einsatz von einem Wasserimmersionsobjektiv ständig in Ringerlösung, wodurch ein Austrocknen verhindert wurde.

Kalzium-Messungen der PN

Das Imaging wurde mit dem T.I.L.L. Photonics ImagingSystem (Deutschland) durchgeführt. Die monochromatische Erregungswellenlänge wechselte zwischen 340 nm und 380 nm, dichroic: 410 nm; Emission: LP 440 nm. Die Messungen erfolgten mit einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop und 10x Luft- (für Übersichtsbilder, NA 0,3) bzw. 20x Wasserimmersions-Objektiven (NA 0,5). Die Pixelgröße betrug 1,96 μm x 1,96 μm , bei einem 2x2er Binning auf dem Chip der CCD-Kamera (bei sehr langen Messungen wurde auf ein 4er Binning zurückgegriffen). Die Messungen für die Spontanaktivität dauerten zwischen 4 (1000 Doppelframes) und 10 min (6000 Doppelframes) bei Frequenzen zwischen 1,5 und 10 Hz. Die Duftpräsentation dauerte 4s. Der Duft wurde in einen konstanten Luftstrom eingeführt, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Die Duftorgel wurde computergesteuert. Die Düfte waren in Mineralöl (60% Dampfdruckangepasstes Duftöl/40% Mineralöl) gelöst. 4 μl dieser Lösung wurden auf 1 cm^2 Filterpapier gegeben, welches dann in die

Spritzen der Duftorgel überführt wurden. Die Verdünnung wurde auf den gleichen effektiven Dampfdruck der Düfte angepasst. Die Kontrollen wurden mit einem nur mit Mineralöl getränktem Filterpapier durchgeführt. Die verwendeten Düfte waren: 1Hexanol, 2Octanol, Limonen und Linalool (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Das Protokoll für alle Messungen sah wie folgt aus:



Die zu vergleichenden Abschnitte vor und nach dem Duft waren gleich lang.

Datenbearbeitung

Die Berechnungen zur Bestimmung der Kalziumkonzentrationen erfolgte mit der T.I.L.L. Photonics ImagingSystem-Software Vision. Die Kalziumkonzentrationen für jeden Frame berechnen sich aus der Fluoreszenzveränderung zwischen den beiden Erregungswellenlängen ($\Delta(F340nm/F380nm = \text{Ratio})$) multipliziert mit einem Skalierungsfaktor. Die Veränderungen $\Delta(F340nm/F380nm)$ des FURA sind den Veränderungen des intrazellulären Kalziums in etwa proportional.

Die Identifizierung der Glomeruli erfolgte zum einen anhand der morphologischen Übersichtsbilder der Ratios, in denen die Grenzen zwischen den Glomeruli zum Teil sichtbar sind, zum anderen anhand der während des Stimulus erregten und somit sichtbar werdenden Glomeruli. Es wurden auch Glomeruli, die während der Spontanaktivität aktiv wurden, in die Auswahl genommen. Die

Nummerierung basiert auf dem Antennallobus-Standardatlas für Projektionsneurone (Silke Sachse). Die Zeitspuren wurden für verschiedene Glomeruli wie folgt berechnet: Mittels eines Tools der Vision-Software wurden die relevanten Regionen (Glomeruli) umrandet. Innerhalb dieser Region wurde ein gemittelter Helligkeitswert berechnet, welcher dann über die Zeit aufgetragen wurde. Für die Falschfarbenbilder wurde für jedes Pixel vom Maximum der ersten 3 Sekunden während des Stimulus der Mittelwert aus den drei unmittelbar vor dem Stimulus liegenden Frames abgezogen.

Die so berechneten Zeitspuren wurden dafür verwendet, um zu untersuchen, ob die Mittelwerte der paarweisen Korrelationen (siehe auch weiter unten) über die Zeit abnimmt. Dafür wurden die Zeitspuren in jeweils drei gleich lange Stücke vor der Duftpräsentation (Blöcke 1 bis 3) und nach der Duftpräsentation (Blöcke 4 bis 6) geteilt. Für jedes Teilstück wurde die paarweise Korrelation zwischen den Glomeruli berechnet. Nun wurden die Mittelwerte der entstandenen Korrelationsmatrizen gebildet und miteinander verglichen. Dies geschah nicht für die 5Hz-Messungen. Die restlichen Analysen (Korrelation, Hauptkomponenten, Binning, Eventcounts) wurden mit den in Vision (T.I.L.L. Photonics-Software) berechneten Ratios ($\Delta(F340nm/F380nm)$ x Skalierungsfaktor) durchgeführt. Anders als in der Analyse weiter oben, wurden bei dieser Korrelationsanalyse die Zeitspuren in je ein gleich langes Stück vor und nach der Duftpräsentation unterteilt. Die Korrelation aller möglichen Glomerulipaare wurde berechnet und daraufhin die Mittelwerte der entstandenen Korrelationsmatrizen gebildet und miteinander verglichen.

Die Hauptkomponentenanalyse betrachtet jede zeitliche Veränderung der Kalziumkonzentration eines Glomerulus als einen Vektor in einem multidimensionalen Raum, wobei jeder Glomerulus mit seiner Zeitspur eine Dimension darstellt. Sie berechnet ein

neues kartesisch Koordinatensystem , in dem die erste Achse (Erste Hauptkomponente) die beobachtete Varianz am besten erklärt. Die zweite Achse (Zweite Hauptkomponente) erklärt dann die verbleibende Varianz etc. Nun werden die ursprünglichen Vektoren in dieses neue kartesische Koordinatensystem platziert. Die Hauptkomponentenanalyse wurde in STATISTICA durchgeführt.

Für die Binning- und Eventcountanalyse wurden die Zeitspuren mit Hilfe eines Programms (von Frank Schaupp), welches Textdateien (.txt) in Spike2-Waveformdateien (.smr) umschreibt, in Spike2 überführt. In Spike2 wurden die Zeitspuren auf Peaks (spontan auftretenden glomeruläre Aktivierungen bestimmter Stärke) untersucht und diese in Extraspuren als Events (Punkte) angezeigt. Hierfür wurde die Peakhöhe wie folgt bestimmt: Aus der gesamten Zeitspur, abzüglich des Stimulus und Artefakten zu Beginn der Messung, wurde das Maximum ermittelt. Von diesem Wert wurden 25% abgezogen und der so errechnete Wert als Peak gewertet. Dies geschah für jeden Glomerulus einzeln. Als Kontrolle wurden die Ratios Frame für Frame angeschaut und bei einem spontan auftretenden Event, das heißt im Falle einer spontan auftretenden Erregung eines Glomerulus, der Anstieg in der Kalziumkonzentration ermittelt. Diese Werte stimmten gut mit den Werten der Peaks überein.

Die derart ermittelten Events wurden pro Glomeruli vor und nach der Duftstimulation gezählt und verglichen. Des weiteren wurde für jeden Glomerulus der jeweilige prozentuale Anteil an der Gesamtaktivität vor und nach dem Duftstimulus berechnet. Wurden zum Beispiel für Glomerulus 17 vor dem Duft 23 Events gezählt und betrug die Anzahl aller Events vor dem Duft 100, so war der prozentuale Anteil an der Gesamtaktivität vor dem Duft für Glomerulus 17 = 23%.

Für die Ermittlung gleichzeitiger Events musste als erstes das Binning festgelegt werden, mit dem die Zeitspuren untersucht

werden sollten. Als erster Orientierungspunkt wurde die Messfrequenz genommen. Die Größe des Binningfensters war immer größer als die Länge eines Frames. Als gleichzeitig galten Events die höchstens 666ms voneinander entfernt waren.

Mit Hilfe eines Programms (von Frank Schaupp), welches das Binningfenster über die Eventspuren laufen lässt (die Fenster liegen direkt nebeneinander, es kommt zu keiner Überlappung) und dabei in jedem Fenster die auftretenden Events extrahiert und sie jeweils den Glomeruli zuordnet, konnte festgestellt werden, welche Glomeruli gleichzeitig aktiv waren.

Für die weitere Analyse erhöhter Korrelation zwischen Glomeruli wurden die Rohdaten mit einem Butterworth-Filter hochpassgefiltert, um so den Mittelwert der Spontanaktivität auf Null zu setzen (nur bei 8 von 14 Tieren möglich). Nun wurde eine Differenzmatrix aus den Korrelationen (1) vor und nach der Duftstimulation berechnet. Um nur signifikante Veränderungen der Korrelationen zwischen Glomeruli zu erhalten, wurde die Methode des Bootstrappings (künstliche Vergrößerung des Datensatzes) angewandt werden. Die nun errechneten Veränderungen hatten ein Signifikanzlevel von mindestens 95%. Aus der derart berechneten Differenzmatrix wurde als nächstes der erste Eigenvektor extrahiert (2), welche aus unterschiedlichen Aktivitätsstärken der einzelnen Glomeruli bestand. Anschließend konnten diese extrahierten Aktivitätsstärken mit den gemessenen Antwortstärken verglichen werden und ein Korrelationskoeffizient (3) ermittelt werden.

$$(1) \quad C_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{t=1}^N x_i(t) \cdot x_j(t)$$

$$(2) \quad \Delta C_{ij} = \sum_{n=1}^N \lambda^n \cdot e_i^n \cdot e_j^n \approx \lambda^1 \cdot e_i^1 \cdot e_j^1$$

(3)

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N \xi_i \cdot e_i^1}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^N \xi_i \cdot \xi_i \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^N e_i^1 \cdot e_i^1 \right)}}$$

ξ = Vektor des Musters

e_i^1 = 1. Eigenvektor der Differenzmatrix

λ = Gewicht der Eigenvektoren

2.3. Material und Methoden der Verhaltensexperimente

Alle verwendeten Bienen (*Apis mellifera carnica*-Sammlerinnen) wurden aus institutseigenen Stöcken bezogen. In den Wintermonaten (ab Oktober bis März) wurden sie in einem klimatisierten Flugraum gefangen. Alle Tiere wurden nachmittags gefangen. Tiere, die aus dem Flugraum gefangen wurden, wurden direkt in ein Gläschen gefangen. Bienen aus freistehenden Stöcken wurden mit Hilfe einer Plexiglaspyramide beim Ausfliegen am Stockein- bzw. ausgang weggefangen. Aus der Pyramide wurde sie dann in ein Gläschen überführt. Die Gläschen wurden dann für ca. 10 Minuten auf Eis gelegt, wodurch die Bienen bewegungsunfähig wurden. So konnten sie daraufhin in die Ableitkammern überführt werden. Zur weiteren Fixierung wurde Zahnwachs verwendet, der die Biene am Kopf und am Thorax mit der Ableitkammer verband. Daraufhin wurde mit einer abgebrochenen Rasierklinge ein kleines Fenster in die Kopfkapsel geschnitten, um Zugang zur Einstichstelle für die Färbung zu ermöglichen. Tracheen und Drüsengewebe wurden vorsichtig entfernt. Die Spitze einer Glaselektrode wurde nun mit FURA-Dextran-Kristallen (Kaliumsalz, 3000 bzw. 10000 MW, Molecular Probes, Eugene, USA) beschichtet. Das FURA-Dextran war in 2%igem Albumin gelöst. Mit der derart beladenen Elektrode wurde jetzt in das linke Deuteroerebrum neben dem α -Lobus bzw. leicht unterhalb des Pilzkörpers gestochen (siehe Abbildung 2), mit dem Ziel den IACT zu treffen. Daraufhin wurde das Gehirn mit Ringer (130mM NaCl, 6mM KCl, 4mM MgCl₂, 5mM CaCl₂, 160mM Zucker, 25mM Glukose, 10mM HEPES, pH 6.7, 500mOsmol; alle Chemikalien von Sigma) gespült, um extrazellulär verbliebenen Farbstoff zu entfernen. Die Kopfkapsel der Tiere für die Verhaltensexperimente wurden für Lagerung über Nacht wieder verschlossen. Dazu wurde das herausgeschnittene Stück wieder an

seine Stelle platziert und die Schnittstellen mit Eicosan versiegelt. Diese Tiere wurden daraufhin sattgefüttert.

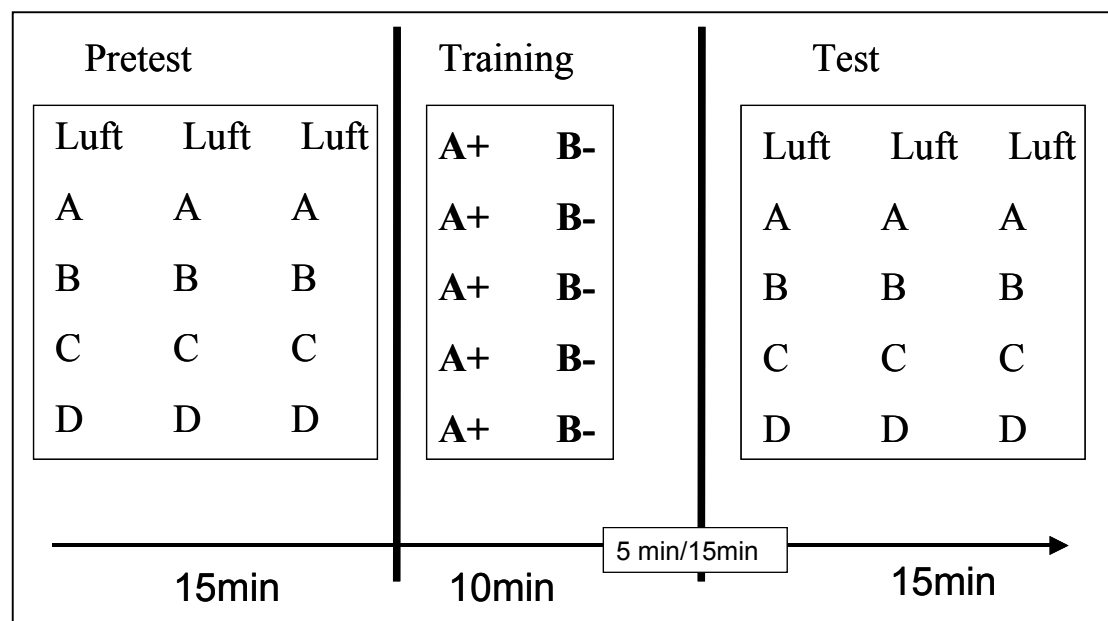
Für allen weiteren Präparationen wurde die Kopfkapsel von knapp unterhalb der Antennenbasis, seitlich bis zu den Augenrändern bis knapp oberhalb der Ocellen aufgeschnitten. Die Antennen wurden leicht nach vorne gehalten und in dieser Position am Scarpus am vorderen Teil des Kopfes mit Eicosan befestigt. Anfangs wurde Philanthotoxin 343 (in geringen Mengen) verwendet, mit dem Ziel, das Gehirn während der Messung so ruhig wie möglich zu halten. Allerdings konnte später der gleiche Effekt erzielt werden, in dem man das Abdomen an die Ableitkammer festwachste.

Der aufpräparierte Kopf und das darin befindliche Gehirn war durch den Einsatz von einem Wasserimmersionsobjektiv ständig in Ringerlösung, wodurch ein Austrocknen verhindert wurde.

Kalzium-Messungen der PN

Das Imaging wurde mit dem T.I.L.L. Photonics ImagingSystem (Deutschland) durchgeführt. Die monochromatische Erregungswellenlänge wechselte zwischen 340 nm und 380 nm, dichroic: 410 nm; Emission: LP 440 nm. Die Messungen erfolgten mit einem Olympus-Fluoreszenzmikroskop und 10x Luft- (für Übersichtsbilder, NA 0,3) bzw. 20x Wasserimmersions-Objektiven (NA 0,5). Die Pixelgröße betrug 1,96 μm x 1,96 μm , bei einem 2x2er Binning auf dem Chip der CCD-Kamera. Bei den Verhaltensexperimenten wurden 65 (13s) Doppelframes bei 5 Hz aufgenommen. Die Duftpräsentation dauerte bei den Verhaltensversuchen 3s. Der Duft wurde in einen konstanten Luftstrom eingeführt, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Die Duftorgel wurde computergesteuert. Die Düfte waren in Mineralöl

(60% Dampfdruckangepasstes Duftöl/40% Mineralöl) gelöst. 4 μ l dieser Lösung wurden auf 1cm² Filterpapier gegeben, welches dann in die Spritzen der Duftorgel überführt wurden. Die Verdünnung wurde auf den gleichen effektiven Dampfdruck der Düfte angepasst. Die Kontrollen wurden mit einem nur mit Mineralöl getränktem Filterpapier durchgeführt. Die verwendeten Düfte waren: 1Hexanol, 2Octanol, Limonen und Linalool (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Das Protokoll für alle Messungen sah wie folgt aus:



Im Pretest als auch im Test wurden die vier Düfte und Luft auf randomisierte Weise in einem Abstand von jeweils 1 Minute präsentiert. Während des Trainings erfolgte die Stimulation abwechselnd (CS+ = A+, CS- = B-, CS+ = A+ usw.) ebenfalls mit 1minütigem Abstand präsentiert. Der Test folgte nach 5 (n=10) beziehungsweise 15 (n=22) Minuten, je nach Gruppe. Die Düfte wurden jeweils 3s präsentiert, während des Trainings erfolgte die 3 Sekunden dauernde Zuckerwassergabe (zuerst Antenne, dann Rüssel) mit einer 1 Sekunden dauernden Überlappung mit dem Duft.

Datenbearbeitung

Die Berechnungen zur Bestimmung der Kalziumkonzentrationen erfolgte mit IDL (Research Systems, CO). Die Kalziumkonzentrationen für jeden Frame berechnen sich im ersten Schritt aus der Fluoreszenzveränderung zwischen den beiden Erregungswellenlängen ($\Delta(F340nm/F380nm = \text{Ratio})$). Aufgrund der starken Spontanaktivität der Projektionsneurone und der individuell verschiedenen Hintergrundfluoreszenz der einzelnen Glomeruli, wurde im nächsten Schritt eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Hierbei wurden von der Zeitspur Frames vor der Duftgabe abgezogen, wodurch alle Zeitspuren auf einen Wert um Null kurz vor Stimulusbeginn überlagert werden. Des Weiteren wurden die Ratios zur shot noise-Reduktion Median-gefiltert (Filtergröße 3 Pixel, zwei räumliche Dimensionen, eine zeitliche Dimension). Als nächstes erfolgte eine Korrektur, um den Streueffekt des Lichtes zu kompensieren. Hierfür wurde ein sogenanntes unsharp image mit einem Radius von $50\mu\text{m}$ generiert, welches dann von jedem Frame abgezogen wurde. Die Veränderungen $\Delta(F340nm/F380nm)$ des FURA sind den Veränderungen des intrazellulären Kalziums in etwa proportional.

Die Identifizierung der Glomeruli erfolgte zum einen anhand der morphologischen Übersichtsbilder der Ratios, in denen die Grenzen zwischen den Glomeruli zum Teil sichtbar sind, zum anderen anhand der während des Stimulus erregten und somit sichtbar werdenden Glomeruli. Die Nummerierung basiert auf dem Antennallobus-Standardatlas für Projektionsneurone (Sachse). Die Zeitspuren wurden für verschiedene Glomeruli wie folgt berechnet: Mit Hilfe eines von Alexander Galkin entworfenen Tools konnten die relevanten Regionen (Glomeruli) in Übersichtsbildern eingefärbt werden. Innerhalb dieser Region wurde ein gemittelter

Helligkeitswert berechnet, welcher dann über die Zeit aufgetragen wurde. Für die Falschfarbenbilder wurde für jedes Pixel vom Maximum der ersten 3 Sekunden während des Stimulus' der Mittelwert aus den drei unmittelbar vor dem Stimulus liegenden Frames abgezogen (Abbildung 34). Für die Abbildungen 21/26/33 erfolgte darüber hinaus eine Mittelung aus den jeweils drei Duftpräsentationen (jeder Duft dreimal vor und dreimal nach dem Training). Für die Abbildung 25oben wurden von den ersten 2 Sekunden während des Stimulus' (vor der Zuckerwasserstimulation) der Mittelwert aus den drei unmittelbar vor dem Stimulus liegenden Frames abgezogen. Für die Abbildungen 25unten wurden von den ersten 2 Sekunden des Zuckerwasserstimulus' (die erste Sekunde ist die letzte Sekunde des Duftstimulus') der Mittelwert aus den drei unmittelbar vor dem Stimulus liegenden Frames abgezogen.

Aus den Zeitspuren wurden einzelne Werte extrahiert. Die Methode (CTV22) berechnet das Integral unter der Zeitspur während des Duftes (innerhalb der ersten zwei Sekunden, somit auch vor der Zuckerwasserstimulation in der Trainingsphase) und zog davon das Integral unter der Zeitspur 1 Sekunde vor dem Duft ab.

Statistische Tests (Wilcoxon und ANOVA) wurden in STATISTICA durchgeführt.