

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Alle Experimente wurden an Arbeiterinnen der Art *Apis mellifera carnica* aus institutseigenen Stöcken vorgenommen. In den Monaten März bis Oktober wurden dazu frei fliegende Bienen am Stockeingang jeweils eines Stockes abgefangen, während in den Wintermonaten Bienen aus einem klimatisierten Flugraum (22-26°C) zur Verfügung standen. Die in die Datenanalyse eingegangenen Tiere stammen jedoch fast ausschließlich aus der Sommersaison (April bis September 2003 und April bis Juni 2004). Die Tiere wurden nach dem Fangen auf Eis bis zur Unbeweglichkeit gekühlt und daraufhin in Metallröhrchen fixiert. Nach dem Wiederaufwärmen wurde der Rüsselreflex durch Benetzen der Fühler mit einem in Zuckerwasser getränkten Zahnstocher getestet. Nur Bienen, die den Rüsselreflex zeigten, fanden Eingang in die Experimente. Das Fangen erfolgte jeweils am Abend des Vortages der Experimente. Die Tiere wurden mit Zuckerwasser gefüttert und über Nacht in einem auf 18-20°C temperierten Raum im Dunkeln aufbewahrt.

### **2.2 Präparation**

Für die elektrophysiologische Registrierung neuronaler Aktivität mit Multielektroden unter Lernbedingungen musste eine geeignete Präparation entwickelt werden. Dabei war zu beachten, dass der präparative Eingriff in das Tier möglichst geringfügig zu halten ist, um eine differentielle Konditionierung auch unter den Ableitbedingungen zu ermöglichen.

Der Kopf des Tieres wurde unmittelbar vor der Präparation mit Hart-Klebewachs (Deiberit 502, Böhme&Schöps Dental GmbH) am Metallröhrchen befestigt. Der Hals saß dabei in einem Schlitz, der die freie Bewegung des Rüssels ermöglichte. Das Wachs musste mit einem Lötkolben erhitzt und geschmolzen werden. Erste Versuche mit bereits durch Handwärme modellierbarem Wachs ergaben unbefriedigende Resultate, da Kopfbewegungen nicht ausreichend verhindert wurden. Zur Freilegung des Gehirns wurde daraufhin ein Fenster zwischen Ocellen und Antennenbasen geschnitten und das darunterliegende Drüsengewebe vorsichtig entfernt. Anfangs war es notwendig, neben den über den Antennalloben liegenden Tracheen auch die Antennen- und Mandibelmuskeln zu entfernen, um durch Muskelpotentiale hervorgerufene Störsignale zu reduzieren. Dies erwies sich jedoch als ein die Qualität des Präparates stark vermindernder Eingriff, so dass später keine Muskeln mehr entfernt wurden. Zudem bewirkte die zunehmende Umschließung der Elektroden durch das umliegende Gewebe

etwa 15-20 Minuten nach der Positionierung im Gehirn eine ausreichende Isolation gegenüber Muskelaktivität. Die Referenzelektrode wurde durch ein kleines Loch in eines der Facettenaugen eingeführt. Für die Registrierung der Aktivität des Muskels M17 wurde ein dünner Silberdraht durch ein Loch zwischen dorso-lateralem Ocellum und Facettenauge in die Nähe des Muskels positioniert. Tropfenweise Gabe von Bienen-Ringer in regelmäßigen Abständen während der Ableitung verhinderte ein Austrocknen des Gehirngewebes. Die Präparation erlaubte über eine Zeitdauer von mindestens 1-2 Stunden die Registrierung stabiler neuronaler Signale.

## 2.3 Versuchsansparatur

Das Kernstück der Apparatur bildeten neben den Multielektroden und der Duftapparatur zwei 8-Kanal-Extrazellulärverstärker, die von einem PC gesteuert wurden. Der Aufbau wird im Folgenden beschrieben.

### 2.3.1 Halterung

Um elektrische Störsignale zu vermeiden, umgab ein Faradaykäfig die gesamte Versuchsansparatur. Eine auf einem gefederten Tisch liegende schwere Eisenplatte diente als Unterlage für ein Binokular, einen Mikromanipulator, den Elektrodenhalter mit Vorverstärker und das Messingröhrchen mit der Biene, welches mit Hilfe einer magnetischen Halterung auf der Platte fixiert war

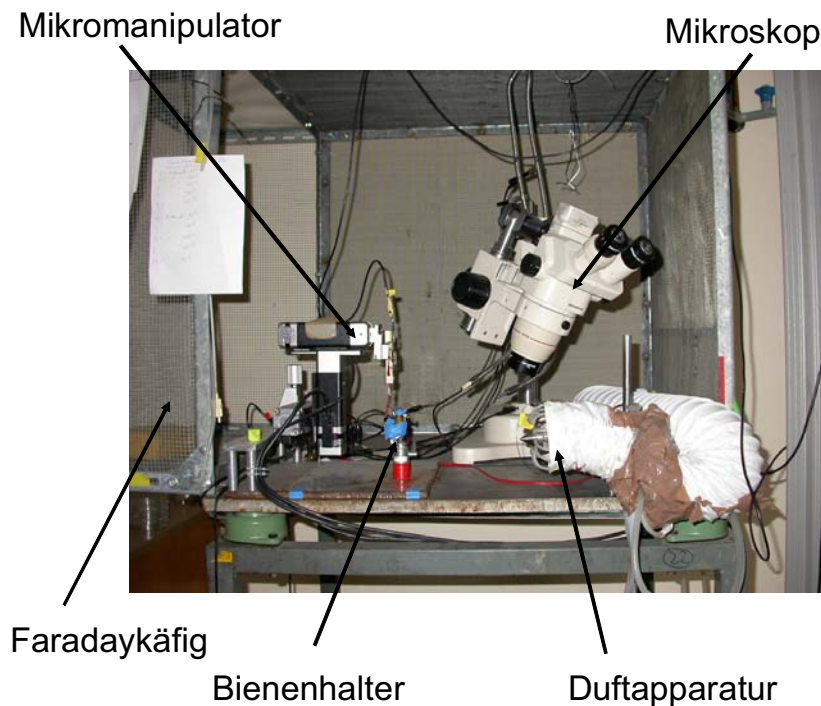
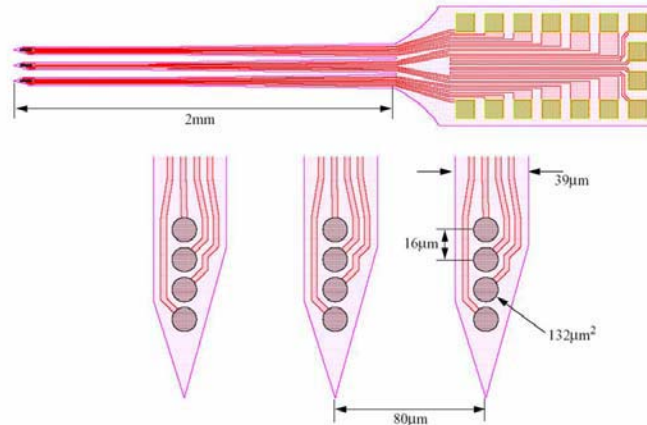


Abbildung 2: Foto des Experimentierplatzes mit Multielektroden und Duftapparatur

### 2.3.2 Multielektroden



**Abbildung 3: Skizze der verwendeten Multielektroden (Center for Neural Communication Technology der Universität Michigan)**

Die für diese Arbeit eingesetzten Multielektroden wurden am Center for Neural Communication Technology der Universität Michigan hergestellt und uns kostenlos zur Verfügung gestellt. In Zusammenarbeit mit der Gruppe um Dr. Daryl R. Kipke (CNCT, University of Michigan) wurden die Schäfte der Multielektroden auf das kleinstmögliche Maß optimiert und der Abstand sowohl zwischen den Kontaktstellen als auch zwischen den Schaften auf das Gehirn der Biene abgestimmt. Die Elektroden bestehen aus einer Gold-Iridium-Legierung und sind auf einem Silikonträger aufgebracht. Dabei liegen jeweils 4 Elektroden übereinander auf einem Träger (Schaft bzw. „shank“). Der Eingangswiderstand pro Elektrode liegt zwischen 2 und 4 M $\Omega$ . Die gesamte „probe“ besteht aus 3 nebeneinander liegenden nicht verrückbaren Schaften, wie in Abb.3 dargestellt. Da der Abstand zwischen den beiden äußeren Schaften immer noch 160 µm beträgt und damit bereits in die Größenordnung des Durchmessers eines gesamten Antennallobus (ca. 200 µm) kommt, war eine beliebige Positionierung nicht möglich, bzw. mußte in vielen Fällen ein Schaft abgebrochen werden, um zu starke Gewebeerstörungen zu vermeiden. Somit lag die Zahl der Elektroden und damit die Anzahl der verschiedenen Ableitorte pro Tier bei acht bis zwölf. Das horizontale und vertikale Positionieren der Elektroden ermöglichte ein über einen Joystick steuerbarer Mikromanipulator (Eppendorf Micromanipulator 5171), der auch die Einstichtiefe über ein Display anzeigte. Da sich das Hirngewebe jedoch bei Aufsetzen der Multielektroden spitzen als sehr elastisch erwies, war eine genaue Bestimmung der Einstichtiefe nur unzureichend möglich.

### 2.3.3 Extrazellulärverstärker

Die an den Elektroden registrierten Extrazellulärsignale wurden gegenüber der sich in einem der Facettenaugen befindlichen Referenzelektrode gemessen, vorverstärkt und mit Hilfe zweier 8-Kanal-Verstärker der Firma Neuralynx (Lynx-8, Neuralynx, Tucson AZ) weiterverstärkt (Abb.4). Ein A/D-Wandler (DT3010 Data Translation A/D board, Data Translation Inc., Marlboro, MA) sorgte daraufhin für die Digitalisierung der Signale. Die Samplingrate lag bei 32 kHz; für die Ableitungen am Pilzkörperausgang wurde dann aus Speicherplatzgründen eine Samplingrate von 20 kHz verwendet, die immer noch eine hohe zeitliche Auflösung für die Spikesignale garantierte. Die Visualisierung der Daten sowie die Filter- und Verstärkereinstellungen erfolgten über eine ebenfalls von der Firma Neuralynx vertriebenen Software (Cheetah Data Acquisition Software, Lizenz für 32 Kanäle) und wurde von einem PC aus gesteuert. Jede Ableitstelle konnte als Spikekanal (Bandpass-Filterung 0.3-6 KHz) oder als LFP-Kanal (Bandpass-Filterung 1/10 – 125 Hz) registriert werden. Es war ebenfalls möglich, einzelne Kanäle mehrfach mit je verschiedenen Filtereinstellungen aufzunehmen. Zwei weitere Kanäle dienten zur Registrierung der Aktivität des Muskels M17.

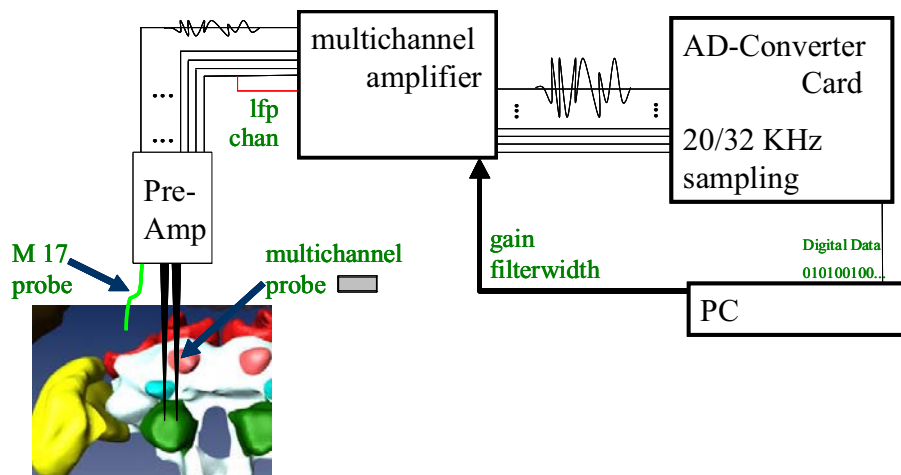


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Verstärkerbaus. Die registrierten Signale wurden mit Hilfe zweier 8-Kanal-Verstärker der Firma Neuralynx (Lynx-8, Neuralynx, Tucson AZ) verstärkt und digitalisiert

### 2.3.4 Duftapparatur

Ein spezielles Olfaktometer (Galizia *et al.*, 1997) ermöglichte die Applikation von bis zu elf unterschiedlichen Duftsubstanzen. Dabei steuerte ein von Frank Schaupp implementiertes Visual-Basic-Programm die Applikation per Computer und bot ein automatisches Protokoll für die differentielle Konditionierung. Eine Aquariumpumpe sorgte für die Luftzufuhr, ein Abzug für die Abfuhr der Düfte.

Als Düfte wurden verwendet die Alkohole 1-Octanol, 1-Nonanol und 1-Heptanol, die Ketone 2-Hexanon und 2-Heptanon, wobei letzteres eine Pheromonkomponente ist, das

Aldehyd 1-Hexanal, der Ester Methylsalicylat und das Terpen Cineol, sowie das Gemisch Pfefferminze. Für diese Düfte ist das glomeruläre Erregungsmuster im Antennallobus der Biene aus optischen Ableitungen („Optical Imaging“) gut bekannt; 1-Hexanal, 1-Octanol, Isoamylacetat und Pfefferminze sind bereits in der Literatur bei Lernexperimenten aufgeführt worden (Faber *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2000; Stopfer *et al.*, 1997a; Wright & Smith, 2004).

## **2.4 Experimentelles Design: Differentielle Konditionierung**

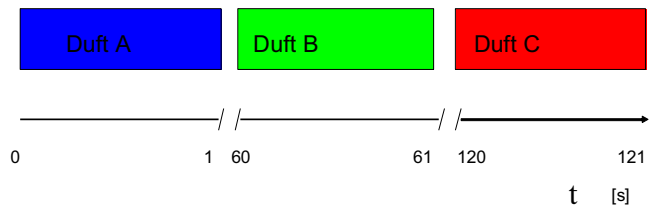
Das Ziel der Arbeit bestand in der Untersuchung lernbedingter Netzwerkveränderungen im Gehirn der Honigbiene mit simultanen extrazellulären Ableitungen. Als geeignetes Paradigma wurde hierfür die differentielle Konditionierung gewählt, welche sich als robustes Lernparadigma erwiesen hat (Kuwabara, 1957; Bittermann *et al.* 1983). Die differentielle Konditionierung besteht aus drei Phasen (Abb.5). In der Prekonditionierungsphase werden dem Tier drei Düfte jeweils dreimal präsentiert. Daran schließt sich eine Konditionierungsphase an, bei der zwei der Düfte trainiert werden. Ein Duft (CS+) wird mit einer Zuckerwasserstimulation (US) auf Antennen und Proboscis belohnt; der andere Duft (CS-) bleibt unbelohnt. Beide Düfte werden jeweils fünfmal präsentiert. Eine abschließende Testphase gleicht der Prekonditionierungsphase.

Bei einer differentiellen Konditionierung lernt das Tier zwischen CS+ und CS- zu unterscheiden, wobei es auf den CS+ als Ankündiger des US mit einem Rüsselreflex (PER) als konditionierte Reaktion antwortet. Als Monitor für diesen Lernvorgang wurde daher in dieser Arbeit der Proboscis extensor Muskel M17 parallel zu den neuronalen Signalen abgeleitet. Eine deutliche Steigerung der Aktivität des M17 während der Präsentation des CS+ in der Testphase wurde so als Indikator für den Lernvorgang gewertet. Der dritte Duft (Ctrl) diente im Experiment als Generalisierungskontrolle für allgemeine Änderungen der Netzwerkaktivität.

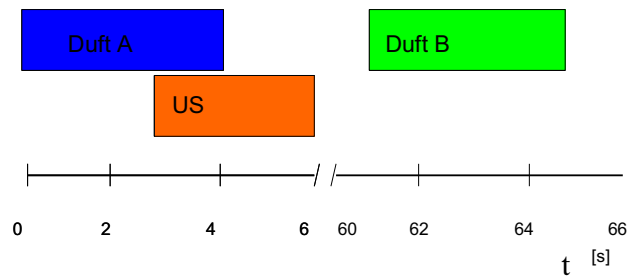
Die zeitlichen Abstände zwischen den Phasen betragen jeweils 5 Minuten. Für den Antennallobus konnte eine signifikante Veränderung des Aktivitätsmusters für den CS+ mit Hilfe des Optical Imaging 5 – 10 min nach Beendigung der Konditionierungsphase beobachtet werden (Faber, 1999; Weidert, 2003). Für längere Zeitintervalle bereitete es Schwierigkeiten, das Tier unter den gegebenen experimentellen Bedingungen am Leben zu erhalten. Die Zeitdauer der einzelnen Duftgaben sowie die Intervalle dazwischen wurden aus bereits vorhandenen Arbeiten übernommen (Faber, 1999; Szyszka, 2005; Weidert *et al.*, 2004).

Die Abfolge der verschiedenen Duftgaben in Prekonditionierungs- und Testphase sollte optimalerweise randomisiert erfolgen, um etwaige Reihenfolgeeffekte von Lerneffekten zu trennen. Dies ist in den von mir vorgenommenen Experimenten jedoch nicht geschehen. Es wurde zumeist eine feste Reihenfolge eingehalten, so z.B die Sequenz CS+ CS- Ctrl CS+ CS- Ctrl Cs+ CS- Ctrl jeweils in Prekonditionierungs- und Testphase.

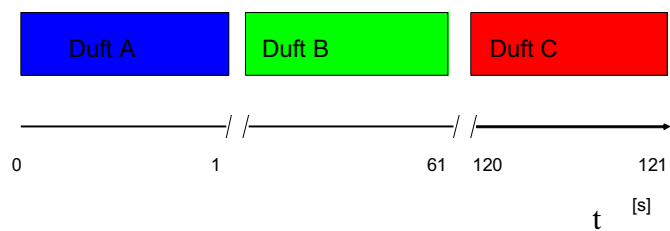
### 1) Prekonditionierung (ABCABCABC)



### 2) Konditionierung (5x CS+, 5x CS-)



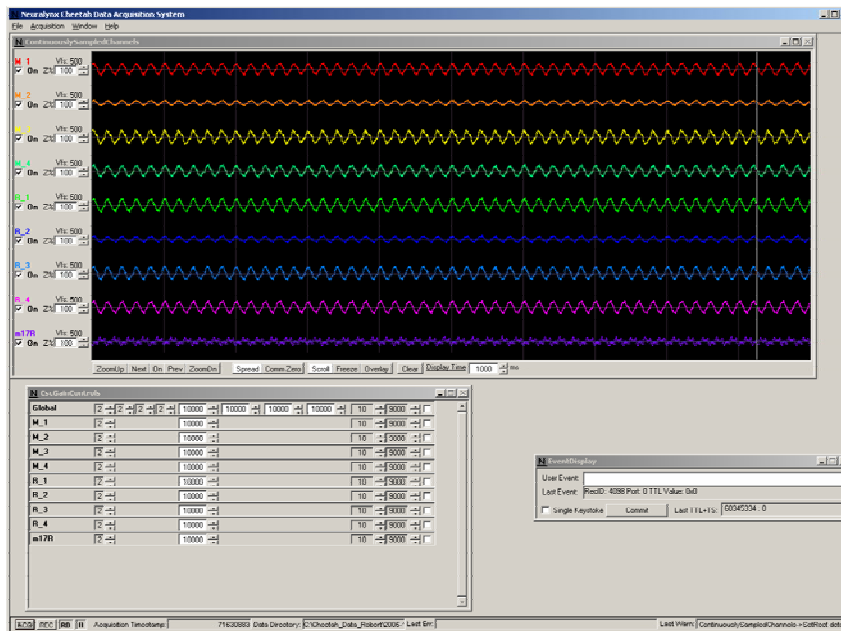
### 3) Test (ABCABCABC)



**Abbildung 5: Schema Differentielle Konditionierung. Das Experiment bestand aus 3 Phasen, deren zeitliche Abfolge in den Skizzen zu sehen ist: 1) Prekonditionierung, 2) Konditionierung, 3) Test. Der Abstand zwischen den Phasen betrug 5 min**

## 2.5 Datenaufnahme und Datenanalyse

Die extrazellulären Signale wurden, abhängig von der Signalqualität, um die Faktoren 10000 bzw. 20000 verstärkt. Um die Datengröße handhabbar zu halten, wurden während jedes Experiments jeweils die neuronalen Signale eine Sekunde vor, während und eine Sekunde nach Duftgabe aufgenommen und gespeichert. Die Neuralynx-Aquisitionsoftware erlaubte dabei während der gesamten Zeitdauer die Visualisierung der Signale.



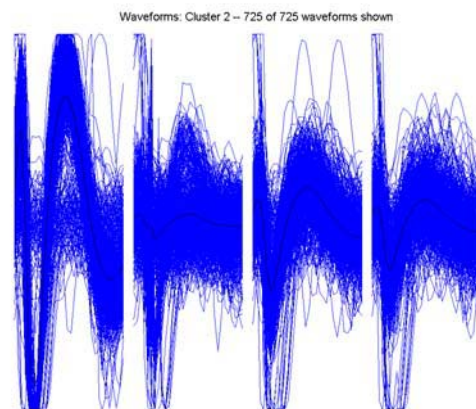
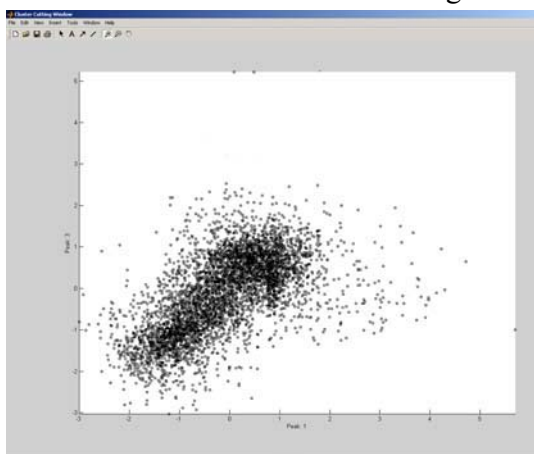
**Abbildung 6: Display-Ansicht des Cheetah Data Acquisition Systems. Die neuronalen Signale konnten im zentralen oberen Fenster verfolgt werden (hier 9 Kanäle) Im linken unteren Fenster ist das Display zur Verstärker- und Filtereinstellung zu sehen**

Zur weiteren offline-Analyse bot sich die Umformatierung der gespeicherten Daten in ein Spike2-Format an. Dazu diente ein von Frank Schaupp geschriebenes Programm. Die Spike2-Software (Cambridge Electronic Design Ltd, Cambridge, UK) bietet viele Vorteile, wenn es darum geht, sich einen ersten Überblick über die Daten zu verschaffen. Neben einer ausgezeichneten Visualisierung sind viele Standard-Analysemöglichkeiten implementiert. Für die standardisierte Untersuchung vieler Datensätze empfiehlt sich jedoch eine Automatisierung. Hierfür wurde die Programmierung von Analyseverfahren in Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA) gewählt. Die Umformatierung der Spike2-Daten in Matlab-Format ist ebenfalls durch Frank Schaupp geschehen.

## 2.5.1 Spike Sorting und Multi Unit Activity

Eine eingehende Netzwerkanalyse erfordert die Zuordnung der neuronalen Signale, also der Aktionspotentiale, zu den jeweiligen Neuronen. Es existiert für dieses Problem eine Vielzahl von Lösungsansätzen, deren Tauglichkeit jedoch in erster Linie durch die Signalqualität bestimmt wird. Der wichtigste Parameter ist hier sicher das Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Für die hier untersuchten Daten wurden mehrere Verfahren getestet. Eine Methode besteht in der Zerlegung der Spikesignale in charakteristische Eigenschaften wie Spikeamplitude, Spikebreite etc. mit anschließender Clusteranalyse in einem mehrdimensionalen Raum, dessen Dimensionen durch die Charakteristika der Spikes auf den verschiedenen Kanälen definiert sind. Die in Matlab implementierte MClust-Software (BubbleClust, A. Redish, University of Arizona, Tucson, AZ) basiert auf dieser Methode und wurde zuerst ausprobiert. Die Resultate erwiesen sich jedoch als nicht überzeugend. Der Hauptgrund dürfte am schlechten Signal-zu Rausch-Verhältnis liegen. Anders als z.B. in der Heuschrecke *Schistocerca americana*, an der ebenfalls Multielektrodenableitungen vorgenommen wurden (Laurent *et al.*, 1996, 2002, 2003), zeigen lokale Interneurone starke Spontanaktivität (Abel 1997), welche das biologische Rauschen vergrößert. Auch ein anderes getestetes statistisches Verfahren zur Zuordnung von extrazellulär gemessenen Spikes (Pouzat *et al.*, 2002), das im Gegensatz zu Clusteralgorithmen die Gesamtform von Spikes betrachtet, und Template-Matching-Verfahren führte nicht zu besseren Ergebnissen.





**Abbildung 7: Beispiele für einen mit MClust analysierten Datensatz. Die linke Seite zeigt eine zweidimensionale Clusterrepräsentation, bei der die Achsen die Spikeamplituden zweier zum selben Multielektroden-Schaff gehöriger Kanäle darstellen. Durch die hohe Verrauschung der Daten sind keine deutlich voneinander getrennten Cluster auszumachen. Die rechte Seite zeigt die Überlagerung der einem Cluster zugeordneten Spikes. Die Daten stammen von vier einem Multielektroden-Schaff zugehörigen Kanälen. Die vier Bilder zeigen dabei die Verteilung der Spikeformen über die vier Kanäle. Besonders im linken Bild ist dabei ein hoher Anteil falsch klassifizierter Spikes zu erkennen.**

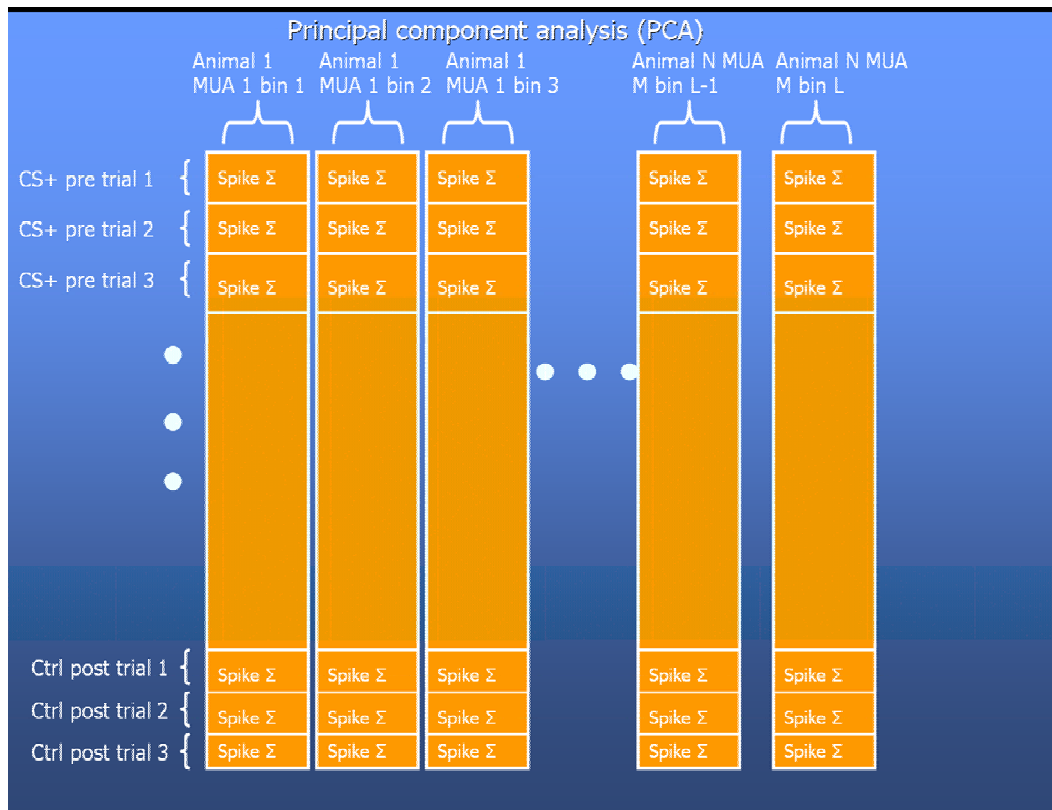
Aus diesem Grund fiel die Entscheidung zugunsten einer auf der sogenannten Multi Unit Activity (MUA) basierenden weiteren Auswertung zur Untersuchung der Spikeaktivität. Eine separate Analyse des lokalen Feldpotentials (LFP) schloss sich ergänzend daran an. Zur Extraktion der MUA-Daten wurde für jeden Spikekanal einer Multielektrodenableitung manuell eine Schwelle gesetzt. Jeder Spike, der diese Schwelle überstieg, wurde in einen dem Spikekanal zugehörigen Event-Kanal geschrieben, in dem sich jeweils der Zeitpunkt der Schwellenüberschreitung befand. Ein Event-Kanal definierte dann eine MUA, d.h., eine zu einer bestimmten Ableitstelle gehörenden neuronalen Einheit, in der sich natürlich mehrere Neurone befinden konnten. In den meisten Fällen befanden sich Spikeprofile, die von einer Elektrode registriert wurden, auch auf den anderen drei Kanälen desselben Schaffes, wenn auch mit unterschiedlichen Amplituden. Um die Gefahr auszuschließen, in zwei MUAs eines Experimentes dieselben Neurone zu haben, konnten pro Tier nicht alle aufgenommenen Kanäle zu einer MUA zugeordnet werden. Die Anzahl der MUAs pro Experiment lag zwischen zwei und sieben.

## **2.5.2 Methoden der Datenanalyse von MUA und LFP**

Peri-Stimulus-Zeit-Histogramme (PSTHs) dienen zur Klassifizierung der MUAs. Mit Hilfe einer auf die PSTH angewandten kumulativen-Summen-Statistik wurden sowohl die Art einer MUA-Duftantwort als auch die Latenz der Antwort bestimmt.

Der Hauptanteil der MUA-Auswertung bestand in einer Untersuchung der Antwortstärken. Zu diesem Zweck wurden für festgelegte Zeitfenster einer Duftgabe pro MUA die Zahl der Spikes innerhalb des Zeitfensters gezählt. Die Antwortstärken der einzelnen Trials des Experimentes konnten so miteinander verglichen werden. Eine Methode, die auch in dieser Arbeit Verwendung gefunden hat, ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA). Eine PCA ist oft dann hilfreich, wenn die Daten multivariat sind, d.h. über viele Freiheitsgrade verfügen. Im Fall der MUAs innerhalb dieser Arbeit stellte sich heraus, dass bedingt durch ein stark variables Antwortverhalten einzelner MUAs und die Tatsache, dass immer nur Subpopulationen des Gesamtnetzwerkes registriert werden konnten, in Einzeltieren keine eindeutigen lernspezifischen Trends beobachtet werden konnten. Das Zusammenlegen der Information aus mehreren Tieren („Pools“) und Anwendung einer PCA auf diese Daten zeigte hingegen deutlichere Ergebnisse (Stopfer *et al.*, 2003). Die PCA dreht die Koordinatenachsen in einem hochdimensionalen System, dessen Dimensionen durch alle möglichen Parameter von Datensätzen bestimmt sind, und findet die Richtungen im Raum, die die größte Varianz innerhalb der Daten einfangen. Somit besteht die

Möglichkeit, eine unübersichtliche Menge von Information auf wesentliche Parameter zu beschränken. Abb.8 skizziert die Aufbereitung der Daten für eine solche Analyse, wobei als Parameter die Anzahl von MUA-Spikes gewählt wurde. Für jede MUA wurde der Antwortverlauf in eine festgelegte Anzahl von Zeitbins unterteilt und die Anzahl der Spikes pro Bin gezählt. Für jeden Duft konnte somit jedes Bin für jede MUA als eine eigene Dimension in einem hochdimensionalen Raum definiert werden. Die Anzahl der Spikes in den Bins aller MUAs stellte dann für den jeweiligen Duft einen eindeutigen Vektor dar. Aus der Abbildung wird auch ersichtlich, dass wie erwähnt mehrere Tiere zusammengefasst werden können.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung einer Datenaufbereitung für eine Hauptkomponentenanalyse für die Differentielle Konditionierung. Die Dimension eines Vektorpunktes entspricht dem Produkt aus der Anzahl der Tiere, der Anzahl der darin enthaltenen MUAs und der Anzahl der Zeitbins pro MUA. Jeder dieser hochdimensionalen Vektorpunkte bildet eine Zeile in der abgebildeten Matrix und somit die Gesamtinformation der Antwortstärken aller MUAs der zusammengelegten Tiere. Für jede MUA wurde der Antwortverlauf in eine festgelegte Anzahl von Zeitbins unterteilt und die Anzahl der Spikes pro Bin gezählt. Bin für jede MUA als eine eigene Dimension in einem hochdimensionalen Raum definiert werden.

Die Frequenzanalyse der lokalen Feldpotentiale geschah mit einer Fast Fourier Transformation (FFT). Eine Unterteilung der Datenspuren in gleitende Fenster machte es möglich, Powerspektren zeitlich aufgelöst zu betrachten.

Für die Untersuchung der Beziehung von MUA-Spikes zur Phase von Oszillationen im LFP war es notwendig, die Phase  $\phi(t)$  der Oszillation zu definieren. Da diese Oszillationen je nach Filterung aus einem ganzen Frequenzband zusammengesetzt sind und in der Zeit variieren, ist dafür ein Verfahren wie etwa die Detektion der Maxima der Oszillationsamplituden und nachfolgende lineare Interpolation nicht möglich. Ein Verfahren zur Bestimmung von  $\phi(t)$ , das hier angewendet wurde, war die Hilbert-Transformation (Harris *et al.*, 2002; Rosenblum *et al.*, 1996). Jedes oszillatorische Signal über der Zeit lässt sich auch in der komplexen Ebene darstellen. Der Verlauf der Oszillationsamplitude  $s(t)$  wird in der komplexen Ebene dabei zu

$$A(t) = R(t) \exp(i\phi(t)) = s(t) + i \underline{s}(t),$$

wobei  $A(t)$  die komplexe Amplitude darstellt und  $\underline{s}(t)$  den Anteil dieser Amplitude auf der imaginären Achse. Dabei ist  $\underline{s}(t)$  die Hilbert-Transformierte von  $s(t)$ , welche durch die Faltung

$$\underline{s}(t) = -1/\pi t * s(t)$$

definiert ist. Mit der Kenntnis von  $\underline{s}(t)$  kann auch  $\phi(t)$  bestimmt werden:

$$\phi(t) = \text{atan}(\underline{s}(t)/s(t)).$$

Tests auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen, wie z.B. mittlere Antwortfrequenzen der MUAs auf unterschiedliche Düfte oder Ratenunterschiede der MUAs für CS+ und CS- nach der Konditionierung erfolgten mit einer nichtparametrischen Version der Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA), dem Kruskal-Wallis-Test.

Alle aufgeführten Auswertmethoden wurden mit in MatLab geschriebenen Programmen durchgeführt. Dies geschah in Kooperation mit Michael Denker aus der Arbeitsgruppe Neuroinformatik und Theoretische Neurobiologie und deren Leiterin, Dr. Sonja Grün