

## 13 Diskussion

### 13.1 Ensembleregistrierungen im AL: MUA und LFP

Der Hauptteil dieser Arbeit umfasste die Registrierung, Charakterisierung und Untersuchung der MUA-Aktivität. Zur Extraktion der Daten wurde für die Spikekanäle manuell eine Schwelle gesetzt. Spikes, die die Schwelle überschritten, definierten dabei pro Kanal eine MUA. Die Entscheidung, aus den Daten MUAs zu extrahieren, fiel im Hinblick auf die Problematik des Spike sorting. Natürlich muß eine jede MUA-Auswertung kritisch beurteilt werden. Die Gefahr, pro MUA mehrere Einzelneurone zusammengefasst zu haben, besteht in Hinblick auf eine Untersuchung der Duftkodierung oder der Plastizität vor allem darin, dass die Auflösung individueller Veränderungen verloren geht und dass einzelne Neurone mehrfach in verschiedenen MUAs auftreten können.

Zunächst kann dem entgegengehalten werden, dass es sich bei dieser Arbeit nicht um MUA im strengen Sinne gehandelt hat. Vielmehr erfolgte die Extraktion pro Tier so, dass die Schwelle pro Kanal individuell gesetzt wurde, um beispielsweise deutlich erkennbare große Spikes von kleineren zu trennen. Zusätzlich wurde nicht von jeder verfügbaren Elektrode eine MUA extrahiert, um Überlappungen von Spikes desselben Neurons zu vermeiden. Dies lag daran, dass beispielsweise nahe aneinander liegende Elektroden in den meisten Fällen dieselbe neuronale Aktivität aufgezeichnet haben.

Ein Hinweis darauf, dass die MUA-Extraktion für die Untersuchungen der Ensembleaktivität und der Ratenveränderungen hinreichend genau war, findet sich in den Hauptkomponentenanalysen. Es konnte so gezeigt werden, dass sich die Ensemblerepräsentationen der Düfte in einzelnen Tieren voneinander unterscheiden und duftspezifische Cluster bildeten. Auch die Analyse der Lernveränderungen ergab deutliche Cluster.

#### 13.1.1 Klassifikation der MUA-Antworten im AL

Eine wichtige Aufgabe, die sich bei der Etablierung der Ableitungen mit Multielektroden im AL der Honigbiene stellte, war der Vergleich der Antwortklassifizierung mit bereits bestehenden Untersuchungen, die sich der Methode der Intrazellulärableitungen und des optical imaging bedienten. Multielektrodenableitungen sollen ja die Kluft zwischen diesen beiden Techniken schließen, indem sie über eine hohe Auflösung im zeitlichen und eine gewisse Auflösung im räumlichen bzw. Ensemble-Bereich verfügen.

Bestätigen die MUA-Antworten die Antwortcharakteristika einzelner PN bzw. LIN? Ist ein kombinatorischer glomerulärer Code der Düfte auch in den MUA-Ensembles zu sehen?

1. In den MUAs wurden alle Antwortcharakteristika gefunden, die auch aus Intrazellulärableitungen im AL der Biene bekannt sind (Abel, 1997; Müller, 2000). Es traten exzitatorische, inhibitorische und off-Antworten auf. Die

exzitatorischen Antworten wiesen sowohl einfache phasisch-tonische Muster als auch komplexere Abfolgen phasischer Exzitation auf. Auch verschiedene Antwortmuster einzelner MUAs auf verschiedene Düfte wurden beobachtet. Zwei wesentliche einschränkende Faktoren sind jedoch das mögliche Zusammenspiel mehrerer Neurone pro MUA und die Unmöglichkeit, MUAs Klassen von Neuronen zuzuordnen, so z.B. PN oder LIN. Es wurde in den meisten Fällen beobachtet, dass dieselben Spikes auf mehreren zu einem Schaft gehörenden benachbarten Elektrodenkanälen auftraten, weswegen nicht alle Kanäle in die MUA-Extraktion mit aufgenommen werden durften. Die Isolierung einzelner MUAs auf einzelne Kanäle durch festere Umschließung des umgebenden Gewebes trat meist nach Wartezeiten von etwa 20-30 min nach Einstich ins Gewebe auf.

2. Die Hauptkomponentenanalyse zeigte in Einzeltieren, dass Repräsentationen verschiedener Düfte vom selben registrierten Ensemble voneinander getrennt werden können, und sowohl das Beispiel in Abb.22 als auch der Zeitverlauf der Abstände der duftspezifischen Cluster in Abb.27-28 zeigen, dass diese spezifische Repräsentation aus der dynamischen Kombination der Antworten einzelner MUAs besteht. Stopfer et al. (2003) zeigten ebenfalls mit einer Hauptkomponentenanalyse für Multielektrodenableitungen aus dem AL von *Schistocerca americana*, dass das Optimum einer duftspezifischen Clusterrepräsentation, also der maximale Abstand der Cluster voneinander, in einem Zeitraum von 200-300 ms nach Stimulusbeginn erreicht wird. Obwohl die Zeitauflösung für die Dynamik der Clusterabstände in der vorliegenden Arbeit größer ist (300 ms gegenüber 50 ms bei Stopfer), findet sich auch hier ein Maximum der Clusterabstände, welches bei 40 % der Tiere zwischen 0 und 300 ms, bei 60% zwischen 300 und 600 ms liegt. Allerdings ist nicht bestimmt worden, wie lange die Düfte vom Olfaktometer zum Erreichen der Antennen benötigten.

Der Durchmesser von Glomeruli im AL der Honigbiene schwankt zwischen 25 und 50  $\mu\text{m}$ . Die Abstände benachbarter Elektroden auf einem Schaft der verwendeten Multielektroden betragen 16 $\mu\text{m}$ , die Abstände benachbarter Schäfte 80 $\mu\text{m}$ . Zieht man in Betracht, dass in den meisten Fällen direkt benachbarte Elektrodenkanäle auf einem Schaft wegen der Gefahr der Mehrfachregistrierung derselben Neuronen nicht gleichzeitig für die MUA-Extraktion verwendet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass pro Tier über die Reichweite mehrerer Glomeruli abgeleitet wurde. Damit würde in den Multielektrodenableitungen auch bestätigt, dass im AL Düfte durch die kombinatorische dynamische Erregung glomerulärer Muster repräsentiert werden.

### **13.1.2 Charakterisierung Oszillationen des LFP im AL**

Oszillationen im AL traten sowohl spontan als auch duftinduziert auf. Da das LFP Summenaktivität von Neuronenverbänden reflektiert, stellte sich bei der

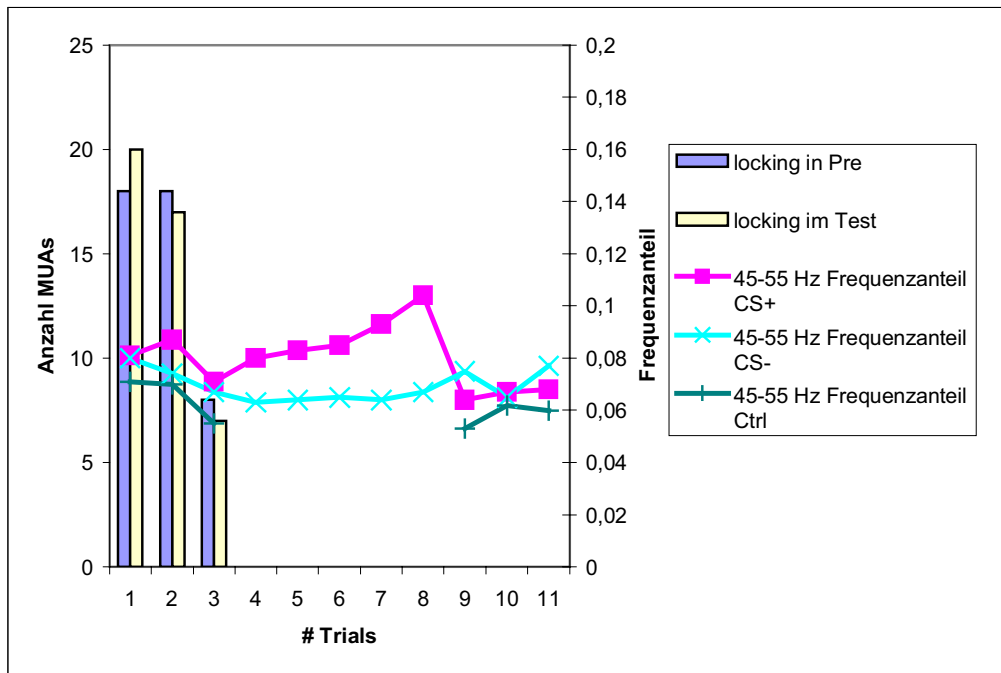
Charakterisierung der Duftantworten die Frage, ob die Frequenzanteile der Oszillation duftspezifisch sind und somit Information über die Identität von Düften in den LFP-Oszillationen liegen. Ähnliche Studien aus dem AL von *Manduca sexta* (Christensen *et al.*, 2003) und dem OB des Salamanders *Ambystoma tigrinum* (Dorries *et al.*, 1997) ergaben für Invertebraten wie Vertebraten nur geringe Frequenzunterschiede für verschiedene Düfte in den LFP-Oszillationen. Christensen *et al.* beobachteten vielmehr, dass die Frequenzspektren eher ableitortspezifisch als duftspezifisch sind und legten nahe, dass LFP-Oszillationen lokal eingeschränkt auftreten, eventuell sogar in einzelnen Glomeruli. Korrelationen von PN-Spikes mit LFP-Oszillationen wurden hier nicht beobachtet. Christensen *et al.* kommen daher zum Schluss, dass Information über die Duftidentität vorrangig im räumlichen glomerulären Code und nicht in einer zeitlichen Koordination der PN-Aktivität liegt (Christensen *et al.*, 2000, Christensen *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu existieren Modelle (Laurent, 2002; Stopfer *et al.*, 1997, Laurent *et al.*, 1994, 1996), die sich besonders auf Untersuchungen in *Schistocerca americana* stützen und von einer globalen, durch die exzitatorisch-inhibitorischen Verschaltungen von PN und LIN im AL erzeugten LFP-Oszillation ausgehen und diese als Referenz für die transiente Synchronisation verschiedener PN pro Oszillationszyklus ansehen. Während frühere Studien der Laurent-Gruppe Duftkodierung im AL in einer duftspezifischen Abfolge transientser Synchronisierung von einzelnen PN-Verbänden realisiert sahen, wurde oszillatorische Synchronisation später eher als Mechanismus für das „sparsening“ im MB angenommen (Perez-Orive *et al.*, 2002). Die LFP-Registrierung selbst geschah jedoch dabei immer im MB und nicht im AL, wie bei Christensen. LFP-Ableitungen im OB des Zebrafisches (Friedrich *et al.*, 2004) ergaben eine wellenartige globale Ausbreitung der LFP-Oszillation und suggerieren ebenfalls eine Funktion als Taktgeber. Hier wurde Phase locking intrazellulär registrierter PN zur Oszillation beobachtet. Wie stehen nun die Ergebnisse dieser Arbeit in Relation zu den widersprüchlichen Ansichten?

Zunächst ist die Untersuchung duftinduzierter LFP-Oszillationen limitiert durch die Vorgabe des Experiments, d.h. durch die differentielle Konditionierung. Dies bedeutet, dass pro Duft nur 3 Stimulationen in der Prekonditionierung gegeben wurden, auf die sich die Charakterisierung begrenzen musste, um mögliche konditionierungsspezifische Veränderungen auszuschließen. Duftinduzierte Oszillationen traten unzuverlässig und mit relativ komplexer Zusammensetzung in den Frequenzbändern auf.

1. Es konnte keine duftspezifische Frequenzzusammensetzung der Oszillationen gefunden werden. Derselbe Duft rief bei unterschiedlichen Tieren unterschiedliche Spektren hervor. Da sich der Ableitort bei jedem Tier an einer anderen Stelle des AL befand, unterstützt dies die Vermutung, dass Oszillationen nicht global, sondern eher lokal im AL auftreten. Die simultane LFP-Registrierung an den beiden 80µm entfernten Elektroden ergab jedoch in jedem Tier fast identische Frequenzzusammensetzungen, so dass dies eigentlich *gegen* ein lokales LFP spricht. Es ist aber zu bedenken, dass z.B. bei Christensen *et al.* in *Manduca* der Abstand zweier simultan abgeleiteter LFP-Spuren mindestens 270µm betrug. 80µm liegt im Bereich von ca. 3 Glomeruli, so dass der Abstand hier möglicherweise zu eng war, zumal die Tiefpassfilterung für eine LFP-Registrierung weiter in den Raum „sehen“ kann als bei den MUA-Registrierungen.

2. Die unterschiedlichen Düfte an *derselben* Ableitposition *im selben* Tier hingegen riefen, anders als bei Christensen, in der Regel unähnliche Spektren hervor. Man könnte daraus folgern, dass das LFP lokal die Aktivität unterschiedlicher neuronaler Ensembles reflektiert, welche sich aus der duftspezifischen glomerulären Kombination zusammensetzen. Auch war hier, ähnlich wie bei den MUAs, eine teils starke Variabilität duftinduzierter LFP-Oszillationen bei aufeinander folgender Stimulationen mit demselben Duft zu verzeichnen. Um überhaupt eine Antwortcharakterisierung vornehmen zu können, musste über alle 3 Trials gemittelt werden. In vielen Fällen traten überhaupt keine duftinduzierten Oszillationen auf, oder nur in einem der 3 Trials in der Prekonditionierung für einen Duft. Eine solche Variabilität spricht gegen die Funktion der Oszillation als *globalen Taktgeber* zur Kodierung der Duftidentität. Auch wenn, wie oft suggeriert (Stopfer, 1997), Oszillationen eher zur Feinunterscheidung zwischen ähnlichen Düften im AL dienen würden, spricht eine so starke Variabilität in den einzelnen Trials gegen diese Möglichkeit. Eine zuverlässige Kodierung sollte eine ebenso zuverlässige Oszillation voraussetzen. Harris (Harris, 2005), der bereits in der Einleitung erwähnt wurde, leitet aus der Hypothese Hebb'scher Ensembles 4 Schlussfolgerungen für das Verhalten dieser Ensembles ab, von denen eine gerade die Variabilität ist. Er spricht vom Zusammenspiel sensorischer Ensembles (wie das ORN-PN-LIN-Netzwerk) und Ensembles, die mögliche interne Zustände reflektieren. Diese könnten durch Rückkopplungen aus höheren Zentren realisiert sein, beispielsweise aus den MB-Ausgängen. Studien an  $\alpha$ -L extrinsischen Neuronen deuten auf solche Rückverbindungen hin (Rybak, 1993) .
3. Bemerkenswert ist der hohe Anteil des 45-55 Hz Bandes an den dominanten Frequenzen in den duftinduzierten LFP-Oszillationen und das locking von 30% aller MUAs darauf. Da die Zeitfenster, in denen MUAs zum LFP während der Duftgabe gelockt sind, variabel über aufeinander folgende Trials sind und sich auch von Prekonditionierung zu Test verändern, ist eine Kodierung der Duftidentität über diese Korrelation unwahrscheinlich. Abb.92 (a) zeigt, dass sich *global* aber das locking durch die Konditionierung, ebenso wie der Anteil des Frequenzbandes 45-55 Hz im Powerspektrum, nicht verändert. Man könnte daraus ableiten, dass das locking zu diesem Frequenzband eine Art Invariante und Mechanismus zum Transfer der olfaktorischen Information von AL zu MB darstellt und den sparse Code in den KC ermöglicht. Die Arbeit von Perez-Orive et al. (Perez-Orive et al., 2002b) an *Schistocerca americana* liefert starke Hinweise auf die Funktion der KC als Detektoren koinzidenten Inputs der PN. Dies geschieht teils durch den Einfluss der Aktivität inhibitorischer Neurone des lateralen Horns, teils durch aktive Membraneigenschaften der KC selbst. Die Neurone des lateralen Horns zeigen dabei eine den PN um 90° verschobene Phasenbeziehung zur Oszillation des LFP im AL. Beide Mechanismen stellen ein nur eng begrenztes Zeitfenster zur Verfügung, innerhalb dessen ein synchroner Input von PN zu Aktionspotentialen in den KC führen kann. Diese Mechanismen würden zu einem sparse coding innerhalb der Pilzkörper führen. Eine Möglichkeit wäre, dass die 50 Hz Oszillationsfrequenz im LFP pro Oszillationszyklus gerade ein Zeitfenster zur Verfügung stellt, das dem der KC optimal angepasst ist. Natürlich müsste zur Überprüfung dieser Hypothese in der Honigbiene ein

Experiment erfolgen, welches ein solches optimales Zeitfenster ermittelt. Eine Zunahme synchron auftretender Spikes führte nicht zur Erhöhung der LFP-Amplitude, so dass die 45-55 Hz Oszillationen durchaus nicht eine bloße Widerspiegelung von summierten Spikes darstellt, sondern eine koordinierte Netzwerkeigenschaft reflektiert.



**Abbildung 155:** Global bleibt das locking auf das 45-55 Hz Frequenzband auch nach der Konditionierung erhalten. Die Balken stellen die Zahl der in Prekonditionierung und Test gelockten MUAs dar, von links nach rechts: CS+, CS- und Ctrl. Der Anteil des Frequenzbandes 45-55 Hz am auf 1 normierten Powerspektrum ändert sich nicht oder nur geringfügig für CS+, CS- und Ctrl durch die Konditionierung (Fehlerbalken sind aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen worden). Daten für alle N=23 Tiere. Beide Befunde lassen die Möglichkeit einer Invariante für den Informationstransfer AL-MB zu

### 13.1.3 Veränderungen der Ensembleaktivität durch die Konditionierung im AL

Die hauptsächliche Fragestellung dieser Arbeit war, ob Plastizität in neuronalen Ensembles des olfaktorischen Systems der Honigbiene infolge assoziativen Lernens auftritt. Für den AL können folgende Aussagen gemacht werden:

1. In Einzeltieren zeigt die Untersuchung der MUA-Antwortstärken über alle Trials des Experiments hinweg ein komplexes heterogenes Verhalten. Im einzelnen Tier ließen sich daher keine eindeutigen Trends feststellen.
2. Von allen 110 MUAs in 23 Tieren zeigten 12% eine deutliche Umstrukturierung ihres Antwortverhaltens in der Testphase gegenüber der Prekonditionierung.
3. Die Untersuchung der Antwortstärkeänderungen über alle MUAs und Tiere hinweg ergab, dass die Mehrzahl der MUAs für CS+ und CS- ihre Antwortstärke im Test verringert haben. Wird nach einer *signifikanten* Änderung gegenüber der Prekonditionierung *ohne Berücksichtigung des Vorzeichens* gefragt, dann zeigten signifikant mehr MUAs für den CS+ eine Änderung als für CS- und Ctrl.
4. Eine Hauptkomponentenanalyse ergab, dass Prekonditionierungs- und Testphase für CS+, CS- und Ctrl deutliche Cluster bildeten. Der Abstand zwischen beiden Phasen war hier für CS+ und CS- größer als für Ctrl und für CS+ leicht größer als für CS-. Zur Clusterbildung war die Zusammenlegung einer Mindestanzahl von Tieren notwendig. Die Analyse zeigte jedoch, dass das Ergebnis nicht durch die Abweichung einzelner „Ausreißer“ verursacht wird.
5. Im LFP zeigte sich für den CS+ eine signifikante Verschiebung vom 41-100 Hz auf das 15-40 Hz-Band im Powerspektrum in der Testphase gegenüber der Prekonditionierung.

### 13.1.4 Mögliche Schlussfolgerungen aus den Änderungen im AL

Da in der vorliegenden Arbeit anhand der Ableitung des M17 Muskels nur 5 von 23 Tieren eindeutig den CS+ gelernt haben, wurde diese Gruppe zunächst separat untersucht. Im Wesentlichen weichen die Ergebnisse aber nicht von denen der anderen Tiere ab. Auch hier sind keine deutlichen Trends in Einzeltieren zu beobachten. Ein Unterschied ergibt sich im Zeitfenster der ersten 500 ms *nach* Stimulusende, wo die Antwortstärken für den CS+ höher sind als für CS- und Ctrl. Die Hauptkomponentenanalyse zeigte, dass die gelernten Tiere weder alleinige Verursacher der Clusterbildung der Experimentphasen waren noch sich im Ergebnis von den anderen Tieren unterschieden. Auch die LFP-Analyse ergab, dass diese Tiere nicht allein für den Anstieg des 15-40 Hz-Bandes verantwortlich waren. Geht man also davon aus, dass die beobachteten Veränderungen durch die Konditionierung bedingt sind, dann lassen sich diese Veränderungen auch in der Gruppe der anderen Tiere erkennen. Die Stresssituation des Experiments unter Laborbedingungen kann die Lernsituation überlagert haben, so dass eine Verhaltensreaktion bei der Mehrzahl der Tiere ausblieb. Geht man davon aus, dass eine wesentliche Voraussetzung der Netzwerkveränderung auf neuronaler Ebene das zeitlich korrekte Timing der Repräsentation von US und CS in den Konvergenzzentren ist, dann ist dies in den Daten zumindest durch die gleichzeitigen Antworten auf den US und die Düfte in der Konditionierung belegt. Frühere Imaging-Studien und Multielektrodenableitungen im AL der Insekten (Faber, 1999; YU *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2004) und LFP-Registrierungen im AL der Ratte (Ravel *et al.*, 2003) belegten bereits Änderungen der neuronalen Aktivität als Ergebnis olfaktorischer Konditionierung.

Mögliche Mechanismen lernbedingter Veränderungen im AL-Netzwerk werden z.B. bei Faber diskutiert. Eine Variante besteht in einer aktivitätsabhängigen synaptischen Fazilitierung, bei der bereits die Rezeptorneurone durch den Einfluss des VUMmx1 moduliert werden. Eine weitere Variante verbindet die assoziative Fazilitierung von Prä- und Postsynapse mit einem Hebbschen Mechanismus. Dabei konvergiert der US-Informationsweg sowohl mit Rezeptor- als auch mit AL-Interneuronen und führt so zu prä- und postsynaptischer Fazilitierung durch gleichzeitige Aktivierung von CS und US-Informationsweg. Mehrfache Konditionierungstrials aktivieren parallel dazu postsynaptische NO-Synthase (Müller, 1996b; Müller, 1996c). NO als retrograder Transmitter teilt daraufhin der Präsynapse die postsynaptische Erregung mit, was zu einer synaptischen Verstärkung im Hebbschen Sinne führt. Diese Modelle sind bislang nicht bestätigt worden.

Eine synaptische Verstärkung innerhalb des neuronalen, den CS+ übermittelnden Ensembles würde zu Änderungen im Netzwerk führen, die sich mit den Multielektrodenableitungen nachweisen lassen sollten. Wie sollte diese messbare Änderung aussehen?

In der Ratenauswertung der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen CS+ und CS- nur dann, wenn nicht nach dem Vorzeichen der Änderung gefragt wurde. Das AL-Netzwerk besteht aus einer komplexen nichtlinearen Verschaltung exzitatorischer und inhibitorischer Neurone. Eine synaptische Verstärkung innerhalb des CS+ Ensembles kann eine Zunahme der neuronalen Antwortstärke bedeuten. Hinweise dafür finden sich in den erhöhten Kalziumsignalen bei Faber. Da über laterale synaptische Verschaltungen bei erhöhter Antwortstärke zugleich auch Inhibition anderer Neurone verstärkt wird, ist es folgerichtig, dass die gemessenen Änderungen sowohl erhöhte als auch verringerte Antwortstärken beinhalten sollten. Dies war ja auch in den Einzeltieren zu erkennen, wo für individuelle MUAs verschiedene Änderungen zu beobachten waren, nicht aber ein eindeutiger Trend. Im OB von Mäusen wurde beispielsweise gezeigt, dass sich nach differentieller Konditionierung für den belohnten Duft das Verhältnis von inhibitorischen und exzitatorischen Transmittern zugunsten der inhibitorischen verschiebt (Brennan *et al.*, 1998), was ebenso auf verstärkte Antwort inhibitorischer Interneurone hinweist. Eine synaptische Verstärkung des Informationsweges von den Antennen zum MB bei gleichzeitiger lateraler Inhibition könnte zu einer deutlicheren Ausprägung der neuronalen „Duftspur“ des CS+ führen, zu einer Kontrastverschärfung gegenüber anderen Düften.

Zusätzlich führt die anhaltende Erhöhung der PKA-Aktivität durch mehrmalige Konditionierungstrials zur längerfristigen Änderung innerhalb der Zellen, beispielsweise zum Ausbilden neuer synaptischer Verbindungen. Dies kann sich im Rekrutieren neuer Neurone für den CS+ äußern und in der qualitativen Umstrukturierung des Antwortverhaltens einzelner Neurone (Daly, 2004) oder in der Neurekrutierung vorher inaktiver Synapsen (Yu *et al.*, 2004). Eine Rekrutierung neuer MUAs wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden. Zu bedenken ist hier, dass eine Neurekrutierung einzelner Neurone in einer MUA als Erhöhung der Feuerrate fehlinterpretiert werden kann. Außerdem sind pro Tier nur durchschnittlich 4 MUAs extrahiert worden im Vergleich zu 16-25 units bei Daly. Auch dort ist bei der immerhin 4 fachen Anzahl von units der Effekt nur klein. Beispiele für eine qualitative Änderung im Antwortverhalten sind aber auch in der vorliegenden Arbeit vorhanden.

Die Verschiebung für den CS+ im LFP-Powerspektrum zu einem niederfrequenten Anteil ist ein weiterer Hinweis auf eine Netzwerkänderung spezifisch für das CS+ Ensemble.

Allerdings lag der Anteil des 15-40 Hz-Bandes für den CS+ in der Prekonditionierungsphase niedriger als für CS- und Ctrl, wenn auch nicht signifikant. Dies kann einmal darauf zurückzuführen sein, dass in den meisten Experimenten in der Prekonditionierung der als CS+ gewählte Duft als erster appliziert wurde. Mögliche duftspezifische Einflüsse konnten ausgeschlossen werden. Die Düfte waren zwar nicht exakt ausbalanciert, die Hauptkomponentenanalyse zeigte jedoch bei den Raten auch beim systematischen Ausschluss einzelner Düfte qualitativ dasselbe Ergebnis. Auch in der LFP-Untersuchung fand sich kein Hinweis darauf, dass ein bestimmter Duft stärkeren Einfluss auf das Experiment hatte als andere.

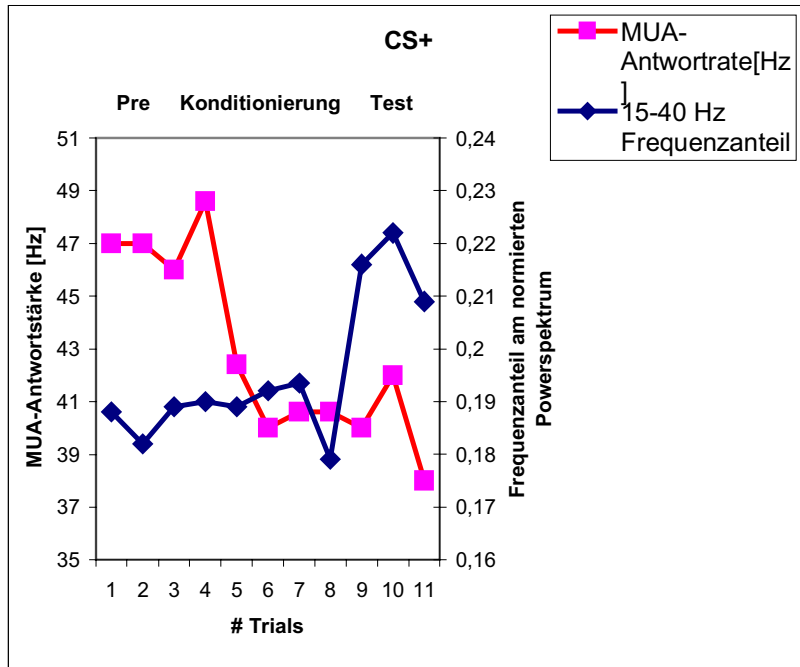
Stopfer (1999) konnte in *Schistocerca* für aufeinander folgende Duftapplikationen einen Anstieg im 20 Hz-Bereich des LFP-Powerspektrums im MB zeigen; wobei der Ursprung der Oszillationen im AL angenommen wird (Laurent *et al.*, 2002). Parallel dazu wurden intrazellulär PN abgeleitet. Sie zeigten Abnahme ihrer Antwortstärke, jedoch eine Zunahme der Korrelation mit dem LFP. Dieser Befund könnte also auf eine Zunahme der Synchronisation des auf den Duft antwortenden AL-Ensembles hindeuten und wurde als Form des Kurzzeitgedächtnisses interpretiert. Könnte dieser Effekt verantwortlich für den Anstieg im Powerspektrum für den CS+ im AL der Biene sein? Dagegen spricht, dass das Niveau des 15-40 Hz Bandes für den CS+ während der Trials der Prekonditionierung und der Konditionierung relativ gleich bleibt und erst im Test der Anstieg erfolgt. Ein reiner Serieneffekt wie bei Stopfer (Stopfer & Laurent, 1999b) sollte einen graduellen Anstieg zur Folge haben. Der sprunghafte Anstieg erst im Test deutet hingegen auf eine durch die Konditionierung verursachte CS+ spezifische Änderung hin. Eine andere mögliche Erklärung ist die unbewusste Vorselektion der CS+ Ensembles, die in den Kapiteln über die Raten- und LFP-Auswertung bereits diskutiert wurde. Sowohl die Mittelwerte der Raten als auch die des 15-40 Hz-Bandes zeigten für den CS+ bereits in der Prekonditionierung einen leichten Unterschied zu CS- und Ctrl.

Die Verschiebung im LFP ist nicht direkt und trivialerweise mit dem Rückgang der mittleren Rate korreliert (Abb.156); zudem ist auch ein Rückgang der mittleren Rate für den CS- aufgetreten, ohne dass dieser von einer ähnlichen Veränderung im LFP begleitet wurde. Auch in diesem Frequenzbereich gab es keine LFP-Amplitudenerhöhung bei Auftreten mehrerer synchroner Spikes.

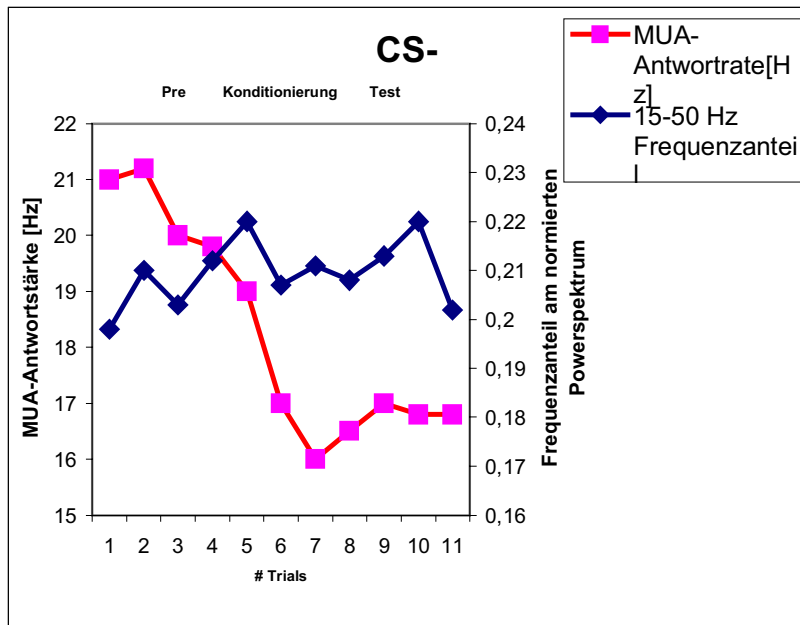
Die Änderung im LFP für den CS+ könnte auf die Ausprägung einer neuen „Eigenschwingung“ im Ensemble hindeuten. Analog zur Ausbildung einer Eigenfrequenz innerhalb eines Ensembles miteinander gekoppelter Oszillatoren in der Physik kann auch hier die Ausprägung einer neuen Oszillationsfrequenz durch die Veränderung der Kopplungsstärke zwischen einzelnen Neuronen stattfinden. Ein einzelner Oszillator bestünde dabei im Zusammenspiel synaptisch verbundener PN und LIN.



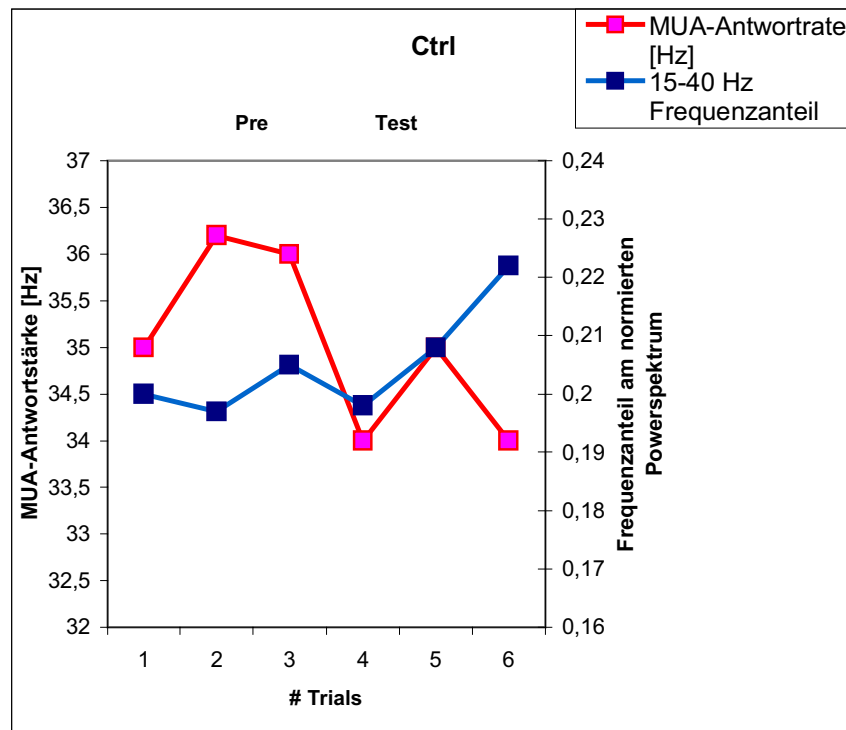
a)



b)



c)



**Abbildung 156: Die Verschiebung im Powerspektrum für das CS+ Ensemble spiegelt nicht die Entwicklung der mittleren Rate wider. Aufgetragen sind die Entwicklung des mittleren 15-40 Hz Anteils am auf 1 normierten Powerspektrum und die mittlere MUA-Antwortstärke über alle Trials der differentiellen Konditionierung und über alle Tiere für die 1. 500 ms der Duftgaben. (a): CS+, (b): CS-, (c): Ctrl. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Fehlerbalken weggelassen worden.**

Wenn aber die Änderung in der Frequenzzusammensetzung im LFP für das CS+ Ensemble im Bereich 15-40 Hz eine Änderung der Kopplung innerhalb des Netzwerkes widerspiegelt, stellt sich die Frage, inwiefern dies mit der global unveränderten Korrelation von Spikes zum 45-50 Hz Ensemble kompatibel ist. Denn angenommen, das locking von Projektionsneuronen zu diesem Frequenzbereich ist eine notwendige Invariante für den Informationstransfer AL-MB, dann sollte sich die „Eigenfrequenz“ des PN-Netzwerkes durch die Konditionierung nicht ändern. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Verschiebung zu 15-40 Hz die gemeinsame Aktivität von PN, LIN und Rezeptorneuronen widerspiegelt, während das locking auf eine bestimmte Klasse von Neuronen, beispielsweise die PN, beschränkt ist.

Es kann keine Unterscheidung getroffen werden zwischen IACT-PN, mACT-PN, LIN und ORN. Dies ist ein wesentlicher Schwachpunkt extrazellulärer Registrierungen neuronaler Aktivität allgemein. So bleibt auch bei den beobachteten Änderungen im AL-Netzwerk unklar, ob nur bestimmte Neuronenklassen dafür verantwortlich sind. Auch wenn beispielsweise LIN extrazellulär viel kleinere Aktionspotentiale verursachen, kann ihre relative nähere Position an einer Elektrode sich stärker ausgewirkt haben als große Aktionspotentiale eines weiter entfernten PN. Ähnlich verhält es sich mit den ORN, allerdings sind häufige Registrierungen von ORN eher unwahrscheinlich, da deren Axone nicht im Innenbereich des AL angesiedelt sind. Bedingt durch die Länge der Schafte und Einstichtiefen von teilweise 200  $\mu\text{m}$  müssen die Ableitorte der Elektroden sich aber häufig dort befunden haben.

In der Hauptkomponentenanalyse fiel auf, dass die durch die Konditionierung bedingte Ensembleänderung für CS+ und CS- die des Kontrollduftes übersteigt. Aus dieser Analyse könnte man den Eindruck gewinnen, dass sich die Ensembles sowohl für CS+ als auch für CS- gleichermaßen stark ändern. Jedoch ist bei einer Hauptkomponentenanalyse, in die absolute Ratenänderungen als Parameter eingehen, der Einfluss von MUAs mit generell hoher Antwortstärke und dementsprechend starken absoluten Änderungen größer als der von MUAs mit geringerer Rate, die sich vielleicht *relativ* zur Prekonditionierung sogar stärker ändern. Sowohl für CS+ als auch für CS- gibt es einzelne MUAs, die eine besonders starke Änderung während der Konditionierung zeigten (Abb.74, Subgruppe 2 aus der Hauptkomponentenanalyse). Die Wahl *relativer* statt absoluter Änderungen als Parameter löst das Problem nicht, da in diesem Fall MUAs mit Verstärkung ihrer Antwort größeren Einfluss haben als MUAs mit Verringerung der Raten. Aus diesem Grund ist der Eindruck, für den CS- ist die Änderung genauso stark wie für den CS+, vorsichtig zu interpretieren, und wird in der Einzelanalyse der MUAs auch so deutlich nicht wiedergegeben. Dennoch zeigte die Auswertung, dass sich auch für CS- und Ctrl immerhin 40% der MUAs signifikant gegenüber der Prekonditionierung ändern, und dass unabhängig von einer Signifikanzschwelle für CS+ *und* CS- die Mehrzahl der MUAs ihre Antwortstärke absenkten.

Diese Abnahme könnte trivial durch einen habituativen Prozess zu erklären sein. Allerdings sollte die Zuckerwasserstimulation in der Konditionierung einen dishabituierten Effekt haben. Die Abnahme erfolgt aber gerade in der Konditionierungsphase. Eine weitere, spekulative Möglichkeit besteht in einer Art „fast odor learning“ (Bazhenov *et al.*, 2005; Stopfer & Laurent, 1999a), das bereits im Zusammenhang mit dem LFP weiter oben diskutiert wurde. Mehrere aufeinander folgende Duftstimulationen könnten zu einer zeitlichen Präzisierung bei gleichzeitiger Abnahme der Antwortstärke führen, jedoch ist dies in der vorliegenden Arbeit nicht im LFP belegt, und außerdem ist der experimentelle Ablauf ein ganz anderer als bei Stopfer. Eine dritte Möglichkeit könnte darin bestehen, dass auch der CS- als *nicht belohnter* Duft eine Veränderung der neuronalen Aktivität bewirkt hat. Die Abnahme der Antwortstärken für CS+ und CS- könnte in einer Verfeinerung der neuronalen Antwortspur liegen, durch die weniger Neurone durch Verstärkung der Kopplung untereinander und laterale Inhibition den Duft kodieren.

Ein kritisches Experiment, das im Rahmen dieser Arbeit nicht gemacht wurde, betrifft den Zusammenhang von CS und US. Hätte auch ein Experiment, in dem das CS-US

Intervall bewusst so gewählt würde, dass eine Assoziation auszuschließen wäre, ähnliche Änderungen der neuronalen Aktivität zur Folge? Wäre die Erregung des VUMmx1 außerhalb einer Paarung mit einem CS durch die starke Innervierung des AL bereits ausreichend für eine Änderung im Ensemble bzw. könnte man diese Änderungen qualitativ auseinanderhalten? Hier wäre es aber unwahrscheinlich, dass sich Änderungen im CS+ Ensemble von denen im CS- Ensemble unterscheiden, da die Innervierung unspezifisch ist und Änderungen im gesamten Netzwerk zu erwarten wären.

Eine weitere Frage ist die nach der Stabilität der Duftkodierung. Die Änderungen der neuronalen Antworten dürfen nicht so stark sein, dass die Repräsentation Duftidentität als solche nicht mehr gewährleistet ist (Peele, 2005). Im Kapitel über die Ratenauswertung wurde aber gezeigt, dass sich die Duftidentitäten in der Testphase im Vergleich zur Prekonditionierung trotz der unterschiedlichen Bedeutung als CS+, CS- oder Ctrl noch erkennen und von anderen Düften abgrenzen lassen. Diese Invarianz der Repräsentation bezieht sich auf das gesamte abgeleitete Ensemble.

### **13.1.5 Die Zusammenlegung mehrerer Tiere**

Ein wesentliches Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse bestand darin, dass sich die in CS+, CS- und Ctrl eingeteilten Stimuli und die einzelnen Experimentphasen nur bei einer Mindestanzahl von zusammengelegten Tieren zu Clustern gruppierten. Die Interpretation ist die folgende:

In jedem einzelnen Tier konnte immer nur von einem Teil des duftkodierenden Ensembles abgeleitet werden, durchschnittlich 4 antwortende MUAs. Geht man davon aus, dass sich die Tiere anatomisch und physiologisch nicht stark von einander unterscheiden, und dass der glomeruläre Code über die Tiere hinweg sehr ähnlich ist, dann kann man die Ableitung neuronaler Aktivität in 23 verschiedenen Tieren an jeweils verschiedenen Orten interpretieren als die Ableitung von *einem* Tier an 23 unterschiedlichen Stellen (Stopfer *et al.*, 2003). Da durch die Konditionierung bedingte Veränderung in den Klassen CS+, CS- und Ctrl stärker zu sein scheint als die Klassifizierung in Duftidentitäten, kann man davon ausgehen, mit dieser Sichtweise einen relativ großen Bereich des Netzwerkes in einem hypothetischen Tier registriert zu haben.

## **13.2 Ensembleregistrierungen im $\alpha$ -L: MUA und LFP**

Von den Kenyonzellen innerhalb des MB konnten aufgrund ihrer geringen Größe keine extrazellulären Signale abgeleitet werden. Deshalb konzentrierte sich diese Arbeit auf die Registrierung MB-extrinsischer Neurone. Auch hier geschah die Extraktion der zu analysierenden Spikesignale aus den Rohdaten mit einer Schwellenextraktion, also MUA. Die Extraktion im Ausgangsbereich des MB ist näher an einem eigentlichen Spike sorting als im AL, da weniger Neurone an den Elektroden zugleich auftraten (Abb.97 und 105). Dies reflektiert auch die funktionelle Bedeutung der Ausgangsneurone, die durch die

Integration von MB-Signalen einen hohen Grad an Information, verglichen mit einzelnen Interneuronen im AL, übermitteln dürften.

### 13.2.1 Klassifikation der MUA-Antworten im $\alpha$ -L

Bestätigen auch hier die Ergebnisse frühere Arbeiten?

1. Intrazelluläre Ableitungen MB-extrinsischer Neurone im Gehirn der Honigbiene wurden vor allem am PE1-Neuron (Mauelshagen, 1991a; Mauelshagen, 1993b) und an  $\alpha$ -L extrinsischen Feedbackneuronen (Grünewald, 1995) vorgenommen. Die in dieser Arbeit abgeleiteten MUAs gleichen in ihrer Antwortcharakteristik diesen Neuronentypen. Eine Charakteristik, die die abgeleiteten  $\alpha$ -L-extrinsischen Neurone von den Neuronen im AL abhebt, ist die gleichartigere Antwort auf verschiedene Düfte, obwohl auch hier Ausnahmen zu verzeichnen waren. Eine weitere ist das seltene Auftreten inhibitorischer Antworten, das auch bei Grünewald beobachtet wurde.
2. Eine Hauptkomponentenanalyse zeigte, dass sich, anders als im AL, MUA-Antworten in Einzeltieren nicht zu duftspezifischen Cluster gruppieren ließen. Ebenso antworteten die einzelnen MUAs ähnlich auf verschiedene Düfte. Zudem zeigten im Gegensatz zum AL *alle* abgeleiteten MUAs eine exzitatorische Antwort auf Zuckerwasserstimulationen sowohl an Antennen als auch an den Proboscis. In einzelnen Fällen wurde auch auf Lichtreize getestet. Auch hier zeigte sich bei den getesteten MUAs eine exzitatorische Antwort. Dies zusammen unterstreicht die Funktion des MB als integratives Zentrum verschiedener Stimuli und das breite Abgreifen  $\alpha$ -L-extrinsischer Neurone von Kenyonzellen verschiedener sensorischer Modalitäten.

### 13.2.2 Charakterisierung der Feldpotentialoszillationen im $\alpha$ -L

Auch bei den Registrierungen im  $\alpha$ -L traten Oszillationen sowohl spontan als auch duftinduziert auf. Analog zum AL riefen Duftstimulationen eine leichte aber signifikante Verschiebung dominanter Frequenzen im Powerspektrum zu höheren Frequenzen hin hervor. Im Vergleich zum AL war die Frequenzzusammensetzung der duftinduzierten Powerspektren jedoch weniger komplex. Die Herkunft der Oszillationen ist im MB unklar. Da sich die Powerspektren in verschiedenen Tieren für dieselben Düfte voneinander unterscheiden, werden sie aber vermutlich lokal auch durch die Aktivität der Ausgangsneurone mit beeinflusst. Dies würde sich auch mit der weniger komplexen Zusammensetzung der Frequenzanteile decken, denn auch die Ausgangsneurone zeigten generell ein ähnlicheres Antwortverhalten auf verschiedene Düfte als im AL. Unglücklicherweise konnte wegen der Bandstopfilterung nicht systematisch getestet werden, ob ein locking von MUA-Spikes zum 45-55 Hz Band der Oszillationen ähnlich stark vorhanden ist. Würde man hier ein noch stärkeres locking auf diesen Frequenzbereich vorfinden, könnte das ein starker Hinweis auf eine tatsächliche Relevanz der 50 Hz-Oszillation für den Transfer AL-MB sein.

### 13.2.3 Ensembleänderungen durch die Konditionierung im $\alpha$ -L

Eine Schwierigkeit bei der Interpretation der Daten ist die funktionelle Verschiedenheit der beiden Neuropile AL und MB. Untersuchungen an Ausgangsneuronen wie dem PE1, die relativ geringe Anzahl von Ausgangsneuronen und ihre integrative Funktion lassen dem individuellen Antwortverhalten einzelner Neuronen vermutlich eine hohe informative Bedeutung zukommen, so dass es unwahrscheinlich ist, hier noch von Netzwerkeigenschaften zu sprechen. So ist es auch hier wesentlich, in späteren Experimenten durch Färbungen die Identität abgeleiteter Neurone zu ermitteln.

Es überrascht das Ergebnis der Ratenanalyse insofern, dass ein stimulusunspezifischer Trend zu höheren Antwortstärken im Test gegenüber der Prekonditionierung zu verzeichnen war. Der einzige signifikante Unterschied zwischen belohnten und unbelohnten Düften ist eine stärkere Zunahme der Spikezahlen in den 2. 500 ms der Duftgabe. Modelle für lernspezifische Veränderungen im MB-Ausgangsbereich (Heisenberg, 2003; Szyszka, 2005) sehen die Neurekrutierung von davor inaktiven Ausgangsneuronen vor. Für die MUA müsste das bedeuten, dass man lediglich für den CS+ eine Zunahme der Antwortstärke bzw. das Auftauchen neuer MUA-Antworten im Test beobachten würde, nicht aber eine generelle Zunahme für alle 3 Stimuli. Da sich aber auch bei den vorliegenden Daten im Bereich des  $\alpha$ -L ähnlich wie beim AL nicht nachweisen lässt, von welcher Art Ausgangsneuronen abgeleitet wurde, kann es sein, dass ein solches Modell tatsächlich zutrifft, die betreffenden CS+ spezifischen Rekrutierungen aber als Einzelfälle untergehen. Bedingt durch die Größe und starre Anordnung der Schäfte der Multielektroden war eine genaue Positionierung beim Einstich nicht möglich. Exemplarisch gab es in der vorliegenden Arbeit MUAs, die ihre Antwortstärke CS+ spezifisch während der Konditionierung erhöht haben (siehe Abb.161-163 im Kapitel über die  $\alpha$ -L Ratenauswertung).

Die einzelnen MUAs zeigten in der Mehrzahl eine nur geringe oder nicht vorhandene Duftspezifität. Es ist daher möglich, dass viele der abgeleiteten Ausgangsneurone andere bzw. zusätzliche Informationen als Duftidentitäten oder die Assoziation Duft/Belohnung übermittelten. Abb.131 und Abb.148 zeigen, dass der Anstieg der Antwortstärke auf CS+ und CS- gegenüber der Prekonditionierung bereits im 1. Konditionierungstrial erfolgte. Dies deutet darauf hin, dass der nicht stimuluspezifische Anstieg zumindest *zusätzlich* interne Repräsentationen wie erhöhte Aufmerksamkeit widerspiegeln könnte. Es ist auch möglich, dass eine durch die Konditionierung bewirkte Plastizität speziell für den CS+ zusätzlich zur Übermittlung interner Zustände die MUA-Antworten moduliert. Natürlich ist es auch bei den  $\alpha$ -L-Ableitungen bedingt durch die geringe Anzahl von klar als gelernt eingestuften Tieren nicht möglich zu sagen, ob eine größere Anzahl CS+ spezifischer Änderungen bei einer höheren Lernrate gefunden worden wäre. Interne Zustände wie Aufmerksamkeit beeinflussen mit hoher Wahrscheinlichkeit die neuronale Aktivität.

Im LFP-Powerspektrum konnte, anders als im AL, kein CS+ spezifischer Effekt gefunden werden. Selbst wenn lernspezifische Veränderungen in den abgeleiteten Tieren aufgetreten sind, muss dies nicht unbedingt verwundern. Wenn die Änderung, wie bei Szyszka beobachtet, auf Ebene der KC (in diesem Falle der clawed KC, welche auf  $\alpha$ -L

extrinsische Neurone verschalten) in einer Verstärkung der Antwort einzelner KC besteht, ohne dass sich die Population der auf den Duft antwortenden KC durch die Konditionierung ändert, und LFP-Oszillationen wie im AL vermutlich nicht die bloße Aufsummierung der Spikeraten widerspiegelt (siehe Abb.154), dann könnte die Invarianz der Population antwortender KC die Invarianz im Powerspektrum bedingen.

### **13.3 Ausblick**

Hat sich die Methode der Multielektrodenableitungen im Gehirn der Honigbiene im Hinblick auf die in der Einleitung aufgeworfenen Fragestellungen bewährt?

Zumindest für die Ableitungen im AL kann gesagt werden, dass eine Änderung der neuronalen Aktivität während der differentiellen Konditionierung spezifisch für den CS+ aufgetreten ist, und dass diese Änderung *im Ensemble* stattgefunden hat und messbar war. Damit hat sich der Vorteil von Multielektroden gegenüber Einzelzellableitungen bewährt. Wesentlich für eine genauere Untersuchung des Netzwerkes ist für zukünftige Arbeiten die Bestimmung der neuronalen Identität. Wichtige Fragen sind, ob die beobachteten Änderungen einer bestimmten Klasse von AL-Neuronen zuzuordnen sind. Ändert sich vor allem das Antwortverhalten der PN, die die gesamte olfaktorische Information zu höheren Zentren bringen, oder spiegeln die Änderungen Umstrukturierungen im gesamten Netzwerk wider, die ein präziseres Timing und eine Kontrastverschärfung gegenüber anderen Duftrepräsentationen ermöglichen? Im Hinblick auf die notwendige Invarianz der Kodierung der Duftidentität ist die zweite Möglichkeit wahrscheinlich. Obwohl global das locking im AL erhalten blieb, hat es sich für die einzelnen MUAs durchaus verändert. Da ja die Mehrzahl der MUAs schwächer auf den CS+ im Test geantwortet haben, wäre es interessant zu untersuchen, ob *weniger* PN *stärkeres* locking aufweisen und damit ein präziseres Timing mit weniger beteiligten Neuronen erreichen würden.

Multielektroden sind auch bei MUA-Registrierung in der Lage, Änderungen im neuronalen Netzwerk zu erfassen. Interessante Effekte wie das locking von MUA-Spikes zur LFP-Oszillation sind weitere Belege für die Stärke der Methode beispielsweise gegenüber bildgebenden Verfahren. Auch hier müssten weitere Analysen Aufschluss darüber geben, ob ein gelernter Duft möglicherweise durch stärkere Synchronisation beteiligter PN gegenüber anderen hervorgehoben wird. Eine interessante Fragestellung ist auch, ob das Blockieren der LFP-Oszillation im 45-55 Hz-Bereich Dufterkennung oder zumindest Diskriminierung von Düften zur Folge hat, wie pharmakologische Experimente von Stopfer (Stopfer, 1997) zeigen.

Sicher ist eine kritische Frage zur Methodik, wie schwerwiegend der Eingriff im lebenden Gehirn ist. Verglichen mit einzelnen Neuropilen haben Multielektroden eine beträchtliche Größe, dennoch hat der messbare Lernerfolg bei zumindest einem Teil der Tiere gezeigt, dass Lernexperimente unter den gegebenen Bedingungen möglich sind.

Die Ableitungen in AL und MB spiegelten die funktionellen Unterschiede beider Neuropile wider. Vermutlich spielen individuelle Ausgangsneurone bei der Konditionierung eine wesentlichere Rolle als im AL. Die vorliegende Arbeit

konzentrierte sich vor allem auf die Analyse des Ensembles und ging weniger genau auf die genauere Untersuchung einzelner MUA-Antworten ein. Zumindest genauso wesentlich wie beim AL ist es, in weiteren Experimenten Identität und Projektionsziele abgeleiteter Neurone zu ermitteln, da die Gesamtinformation über einen gelernten Duft sicher von mehreren Neuropilen ausgelesen wird und es Rückkopplungen gibt.