

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuronale Ensembles

Wahrnehmung ist ein hochgradig selektiver, dynamischer Prozess und hängt stark von der individuellen Vorerfahrung ab. Für uns so selbstverständliche Dinge wie die alltägliche und vertraute Umgebung, welche wir mit unseren Sinnen aufnehmen, täuschen darüber hinweg, auf welcher komplexen Weise eine einheitliche sinnliche Erfahrung von unserem Gehirn zusammengesetzt wird.

Seit dem wegweisenden Ansatz von Donald Hebb in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts stellte sich immer mehr die Bedeutung des Begriffes des neuronalen Ensembles bei der Frage nach der Funktionsweise des Gehirns heraus. Hebb formulierte als einer der ersten die Hypothese, dass neuronale Ensembles die grundlegenden Operationseinheiten im Zentralnervensystem von Säugetieren darstellen (Hebb, 1949). Als neuronales Ensemble bezeichnet man eine Gruppe von Neuronen, deren korrelierte Aktivität etwa externe Stimuli oder interne Zustände im Gehirn repräsentiert. Dieser Ansatz hat sich als außerordentlich fruchtbar erwiesen. Der enorme Fortschritt bildgebender Verfahren etwa zeigt die Beteiligung dynamischer und über weite Bereiche des Gehirns verteilter neuronaler Ensembles bei kognitiven Vorgängen (Tononi *et al.*, 1998)

Das Konzept der neuronalen Ensembles wirft jedoch grundlegende Schwierigkeiten bei der Frage nach der Informationsverarbeitung im Gehirn auf. Eine davon ist das sogenannte Bindungsproblem. So ist beispielsweise bei Säugetieren bekannt, dass die einzelnen Areale des visuellen Kortex auf die Analyse bestimmter Informationsanteile spezialisiert (wie Form, Bewegung, Farbe, räumliche Informationen z.B. Position, Entfernung) und topographisch organisiert sind (Livingstone & Hubel, 1988). Wie wird nun die Aktivität weit verteilter Neurone zu einer einheitlichen Wahrnehmung zusammengebunden? Als ein Lösungsansatz wurde die Bindung räumlich verteilter Ensembles durch zeitliche Synchronisation ihrer Aktivität vorgeschlagen (der Malsburg, 1999; der Malsburg, 2002; Singer, 1999). Als möglicher Hinweis auf Synchronisation gilt neben direkten Befunden (Lohmann *et al.*, 1988) die Tatsache, dass im Feldpotential im Frequenzbereich zwischen etwa 10 und 100 Hz Oszillationen in Nervensystemen weit verbreitet sind, so im visuellen System (Brosch & Eckhorn, 1992) oder im olfaktorischen System sowohl von Vertebraten (Adrian, 1942) als auch von Invertebraten (Laurent, 1996; Laurent *et al.*, 1996; Laurent & Naraghi, 1994). Da allgemein angenommen wird, dass das Feldpotential die Aktivität großer Nervenzellverbände widerspiegelt, deutet oszillatorische Aktivität auf eine zeitliche Ordnung bzw. Gruppierung hin. Oszillationen sind - sowohl räumlich als auch zeitlich- immer wieder in komplexen offenen Systemen auch außerhalb der Biologie anzutreffen und können als ein allgemeiner Mechanismus der Selbstorganisation gelten (Prigogine, 1984).

Eine der faszinierendsten Leistungen von Gehirnen ist ihre erfahrungsabhängige Plastizität bzw. die Fähigkeit, Erfahrung speichern und in entscheidenden Situationen abrufen zu können. Die meisten tierischen Organismen sind einer komplexen, schnell veränderlichen Umwelt ausgesetzt, die eine ständige Anpassung und damit Lernen überlebensnotwendig macht (Hammer & Menzel, 1994). Ausgehend von Hebb's

Konzepten, ist es also ein wichtiger Schritt zu fragen, wie eine solche Plastizität vom Nervensystem und damit von einer Vielzahl funktioneller Nervenzellverbände realisiert wird. Plastizität spielt in Hebb's Theorie der neuronalen Ensembles selbst eine wesentliche Rolle. Erst durch sie könnten Assoziationen gebildet oder Erlerntes gespeichert werden. Hebb schlug als Mechanismus für diese Plastizität vor, dass die gleichzeitige Aktivität einer prä- und postsynaptischen Zelle zu einer Verstärkung der synaptischen Verbindung zwischen ihnen führen würde.

Die Untersuchung von Plastizität in neuronalen Ensembles durch Lernen ist das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit.

## **1.2 Untersuchung neuronaler Plastizität**

### **1.2.1 Technische Zugänge**

Der Fragestellung nach neuronaler Plastizität kann man sich von verschiedenen Richtungen und mit verschiedenen Methoden nähern, die alle ihre eigenen Vor- und Nachteile besitzen. Die möglichen Herangehensweisen lassen sich in mehrere Ebenen aufteilen. Zunächst gibt es den theoretischen und den experimentellen Zugang. Dabei können aus der Physik oder Informatik entlehnte Konzepte wie die Theorie dynamischer Systeme oder modellierbare neuronale Netze eine wertvolle Hilfe für das Bilden konzeptioneller Ansätze sein (Haken, 1994; Hopfield, 1982). Zu ihrer Verifizierung bedarf es dann aber experimenteller Daten. Gerade die numerische Simulation von nichtlinearen Differentialgleichungen, welche die Dynamik des Zusammenspiels der Komponenten eines komplexen Gesamtsystems beschreiben, erfordert eine genaue Kenntnis der experimentell bestimmten Parameter.

Auf der Ebene des experimentellen Zugangs wiederum existieren gegenwärtig sich immer weiter voneinander entfernende Richtungen. So ist auf Ebene einzelner Zellen bereits sehr viel über die Wirkungsweise von Rezeptoren, Neurotransmittern, den Ablauf intrazellulärer Signalprozesse und ihren Einfluß auf Lernen und Gedächtnis bekannt. Man könnte dies als das mikroskopische Ende einer Skala bezeichnen, an deren makroskopischem Ende bildgebende Verfahren wie Positronenemissionstomographie (PET), funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT) oder Elektroenzephalographie (EEG) die Aktivität ganzer Hirnareale sichtbar machen. Wenig ist hingegen von der mesoskopischen Ebene, d.h. von der Ebene kleinerer und größerer Zellverbände, bekannt (Elger *et al.*, 2004). In Hinsicht auf eine Untersuchung der Mechanismen assoziativen Lernens -und darüber hinaus- ist aber gerade dieser Bereich wesentlich. Denn es steht fest, dass im Gehirn der Schritt von molekularen Mechanismen in einzelnen Zellen zur Selbstorganisation von Ensembles vieler Tausend miteinander kooperierender Neurone über makroskopische Entfernungen vollzogen wird.

Es ist das Auffinden von Prinzipien erforderlich, die den reduktionistischen molekularbiologischen Ansatz zwar berücksichtigen, aber durchaus anderen Gesetzen folgen können: „more is different“ (Anderson, 1972).

Welche Mechanismen einer neuronalen Ensemblearchitektur kann man bei einer „Messung“ der Ensembleaktivität erwarten?

Harris (Harris, 2005) leitet aus der Ensemblehypothese vier grundsätzliche Folgerungen ab. Eine wesentliche Annahme ist dabei die interne Kopplung und Interaktion von stimulusgetriebener und interner kognitiver Ensembledynamik. Beide

sind durch rückgekoppelte neuronale Schaltkreise repräsentiert, die synaptisch miteinander verbunden sind.

Folgerung 1: Aktionspotentialverläufe (spike trains) zeigen durch die Interaktion eine zeitliche Struktur, die nicht im externen Stimulus vorhanden ist.

Folgerung 2: Das Antwortverhalten ist nicht streng durch den externen Stimulus determiniert. Dies bedeutet, dass durch Kopplung interner Zustände (z.B. Aufmerksamkeit, Motivation etc.) auch bei exakt gleichen aufeinander folgenden externen Stimuli nicht dieselbe Antwort zu erwarten ist, sondern Variabilität.

Folgerung 3: Die zeitliche Abfolge von Aktionspotentialen verschiedener Neurone eines Ensembles reflektiert die Ensemblearchitektur. Dies ist besonders bedeutend, da so nur durch die Kenntnis der Tätigkeit des gesamten Ensembles Rückschlüsse auf die Kodierungsmechanismen gezogen werden können.

Folgerung 4: Die Muster der Ensembleaktivität müssen mit vorhandenen internen Zuständen korrelieren. Dies bedeutet, dass interne Zustände auch in den observierten Mustern vorhanden sein müssen („top down processing“).

Für die Untersuchung neuronaler Ensembles erweisen sich multiple extrazelluläre Ableitungen neuronaler Aktivität als eine geeignete Technik für experimentelle Untersuchungen (Buzsaki, 2004;Csicsvari *et al.*, 2003;Harris *et al.*, 2003;Nicoletti & Ribeiro, 2002;Singer & Gray, 1995). Sie bieten die Möglichkeit, bei hoher zeitlicher Auflösung simultan die elektrische Aktivität von verschiedenen Neuronen eines Verbandes zu registrieren (siehe Folgerung 3). Die Methode der multiplen extrazellulären Messungen wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt.

## 1.2.2 Neuronale Ensembles und Lernen und Gedächtnis

Über die Mechanismen von Lernvorgängen oder allgemeiner kognitiven Funktionen auf der Ebene neuronaler Ensembles kann bislang oft nur spekuliert werden. Selbst wenn Areale, in denen Gedächtnis gespeichert ist, bekannt sind, bleibt die Frage, wie diese Areale beispielsweise auf motorische Areale wirken, um eine angemessene Reaktion herbeizuführen, oder wie einkommende Stimuli in peripheren sensorischen Arealen mit bereits Bekanntem verglichen werden.

Es wird viel über die Bedeutung oszillatorischer neuronaler Aktivität für Lernen und Gedächtnis diskutiert (Engel *et al.*, 2001;Herrmann *et al.*, 2004b;Herrmann *et al.*, 2004a;Miltner *et al.*, 1999;Seidenbecher *et al.*, 2003;Ward, 2003). Dabei existiert bereits eine Vielzahl von Modellen, deren genaue neuronale Korrelate und Arbeitsweise noch unklar sind.

In-vitro Studien ergaben, dass synaptische Plastizität kortikaler Neurone empfindlich gegenüber der Phase oszillatorischer Inputs ist (Wespatat, 2002). In Pyramidenzellen der Schichten II/III des visuellen Kortex der Ratte wurden dazu postsynaptisch sinusoidal Ströme injiziert (20 oder 40 Hz) und präsynaptisch Input-Signale zu verschiedenen Phasen der Oszillation gegeben. Fiel der Input mit einem Maximum der Oszillation zusammen, wurde synaptische Verstärkung beobachtet, bei gegenphasigem Eingang Abschwächung.

Feldpotentialoszillationen, die mit Gedächtnisleistungen verbunden sind, sind besonders im  $\gamma$ -Bandbereich anzutreffen, der recht widersprüchlich zwischen etwa 15 und 70 Hz angegeben wird (Ward, 2003). Bei operanter olfaktorischer Konditionierung an Ratten ergaben beispielsweise Extrazellulärableitungen im olfaktorischen Bulbus trainierter Tiere einen signifikant erhöhten 25 Hz-Anteil im Powerspektrum des Feldpotentials, der dort jedoch als  $\beta$ -Aktivität bezeichnet wurde (Ravel *et al.*, 2003). Aus Experimenten mit menschlichen Versuchspersonen

entwickelten Lisman und Idiart ein Modell des Kurzzeitgedächtnisses, das sich der Überlagerung von  $\zeta$ - und  $\gamma$ -Oszillationen (6 bzw. 40 Hz) bedient (Lisman & Idiart, 1995). In diesem Modell wird Gedächtnis in Verbänden synchron im  $\gamma$ -Rhythmus feuender kortikaler Pyramidalzellen gespeichert. Da die Synchronisation mit der Zeit dissipiert, soll ein überlagerter 6 Hz- Zyklus zum Wiedereinsetzen der Synchronisation dienen. Solche Zyklen können experimentelle Ergebnisse des „Sternberg memory scanning task“ erklären; die genauen Mechanismen des Modells bleiben aber auch hier unklar.

Herrmann et al. (Herrmann *et al.*, 2004b) schlugen ein Modell zum Vergleich von neuer Information mit gespeichertem Wissen vor, das sie „match - and - utilization model“(MUM) nennen. Der wesentliche Schritt besteht in einem Abgleich zwischen stimulusbezogener Information und Gedächtnisinhalten, welche aktiviert und ins Kurzzeitgedächtnis geladen werden. Das Resultat dieses Vergleiches, „match“ oder „mismatch“, wird dann durch ein weiteres Set von Prozessen ausgelesen. Als Mechanismus wird sowohl bei Abgleich als auch bei Auslese oszillatorische neuronale Synchronisation vorgeschlagen. Dieses Modell kann recht gut mehrere experimentelle Befunde erklären (Kaiser & Lutzenberger, 2003; Miltner *et al.*, 1999; Tallon-Baudry *et al.*, 1998a; Tallon-Baudry *et al.*, 1998b). Beispielsweise zeigten Testpersonen, denen bereits gelernte Objekte präsentiert wurden, signifikant stärkere  $\gamma$ -Band-Aktivität bei EEG-Messungen als bei der Präsentation nicht gelernter Objekte (Herrmann *et al.*, 2004b).

Oszillationen könnten somit als Taktgeber sowohl bei der Anlegung neuer Ensembles als auch beim Informationsabgleich in bottom-up bzw. top-down-Prozessen dienen. Obwohl stark umstritten, könnte ihnen deshalb durchaus eine funktionelle Bedeutung bei der Synchronisierung neuronaler Ensembles bei kognitiven Prozessen zugewiesen werden. Entsprechende Ansätze aus der Physik und der Theorie dynamischer Systeme zeigen immer wieder, dass Synchronisierung räumlich ausgedehnter Systeme, die aus vielen Untereinheiten bestehen, durch oszillatorische Prozesse erfolgen kann (Schuster & Stemmler, 1997).

### **1.2.3 Klassische Konditionierung als Beispiel assoziativen Lernens**

Soll erfahrungsabhängige Plastizität in Nervenzellverbänden untersucht werden, bedarf es zunächst einer geeigneten Definition von Lernen bzw. eines geeigneten experimentellen Paradigmas. Es existiert eine Vielzahl von Lernformen. Allgemein werden nicht-assoziative Lernvorgänge (Habituation und Sensibilisierung) von assoziativen Lernvorgängen, wie klassische Konditionierung und operante Konditionierung, unterschieden. In der klassischen Konditionierung, die erstmals grundlegend von Pavlov (Pavlov, 1927) untersucht wurde, wird eine Assoziation zwischen 2 Stimuli gebildet. Ein zuvor neutraler Stimulus wird zeitlich vorausgehend mit einem bedeutungsvollen Reiz (dem unkontingierten Stimulus, US) gepaart. Das Tier lernt somit, dass der vormals neutrale Stimulus (nun konditionierter Stimulus, CS, genannt) den US voraussagt, und reagiert nach dem Lernakt bereits auf den CS mit einer entsprechenden konditionierten Reaktion (CR), je nach Art des US, z.B. Futter oder Schmerzreiz. Die klassische Konditionierung ist also ein hervorragendes Beispiel für die Fähigkeit von Tieren, bereits *im Voraus* auf ein erwartetes Ereignis zu reagieren, sei es bei der Erschließung neuer Futterquellen oder der Flucht vor einer potentiellen Gefahr. Somit ist die klassische Konditionierung ein geeignetes

Paradigma, um erfahrungsabhängige Plastizität im Nervensystem als neuronales Korrelat der gelernten Assoziation zu untersuchen. Auf der Ebene neuronaler Ensembles treten folgende Fragen auf ( Hammer & Menzel, 1994):

Welches sind die Ensembles, die CS und US im Gehirn repräsentieren?

Wo im Gehirn gibt es eine Konvergenz dieser Ensembles?

Wie wird aus der Konvergenz eine Gedächtnisspur gebildet? Formt sich ein neues funktionelles Ensemble?

Besonders gut untersuchte Beispiele für neuronale Plastizität stellen die Untersuchungen des Kiemenrückzugsreflexes bei *Aplysia* (Hawkins *et al.*, 1983;Walters *et al.*, 1981) und der konditionierten Phototaxis in *Hermisenda* (Alkon, 1975;Crow, 1988) dar. Bei *Aplysia* sind die neuronalen Repräsentationen für CS und US jeweils durch individuelle Neurone gegeben.

#### **1.2.4 Das olfaktorische System der Honigbiene als geeignetes Modellsystem**

Der Idealfall experimenteller Studien assoziativer Lernprozesse wie der klassischen Konditionierung in neuronalen Ensembles ist natürlich die Untersuchung am lebenden Tier, also an einem intakten Nervensystem. Die Komplexität von Säugetiergehirnen auf der einen Seite und ein begrenztes Verhaltensrepertoire bei Tieren wie *Aplysia* auf der anderen machen Insekten dafür interessant, die trotz kleiner Gehirne differenziertes Verhalten aufweisen können.

Die Honigbiene zeigt ein besonders umfangreiches Verhaltensrepertoire. Während ihrer Sammelflüge ist sie in der Lage, sich eine Vielzahl von Parametern wie Farbe und Geruch der Futterquelle oder die Entfernung und Ausrichtung zum Stock einzuprägen. Einmalig unter Insekten macht sie auch die Fähigkeit, diese Parameter mit Hilfe ihrer Tanzsprache den anderen Bienen des Stockes mitzuteilen (von Frisch, 1965). Das Gehirn der Honigbiene umfasst etwa eine Million Neurone und bietet damit ein wesentlich überschaubareres System als Vertebraten.

Zwei Gründe machen nun das olfaktorische System der Honigbiene für die Fragestellung neuronaler Plastizität interessant.

Zum einen spielen Düfte bei Bienen eine zentrale Rolle. Gerüche dienen zum Erkennen und Finden von Nahrung und über Pheromone auch zur Kommunikation. Somit sind assoziative Lernvorgänge in Bezug auf Duftreize für Bienen von entscheidender Bedeutung. In Hinblick auf die klassische Konditionierung konnte mit Hilfe der Rüsselreflexkonditionierung (Proboscis Extension Reflex, PER) an fixierten Bienen ein standardisiertes Experiment unter Laborbedingungen entwickelt werden, das sich als besonders robust erwiesen hat (Kuwabara, 1957;Menzel & Bitterman, 1983).

Zum anderen zeigt das olfaktorische System der Insekten eine starke Ähnlichkeit zu dem der Vertebraten, so dass Studien an Insekten auch generelle Rückschlüsse auf allgemeine Mechanismen der Duftprozessierung im Gehirn zulassen (Hildebrand & Shepherd, 1997).

Das olfaktorische System der Honigbiene diente daher in dieser Arbeit als geeignetes Modellsystem.

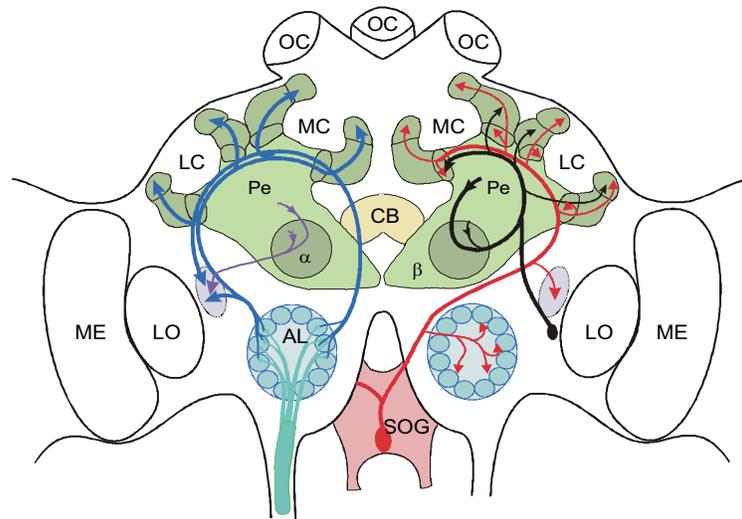
Anatomie und Physiologie des olfaktorischen Systems der Honigbiene sind bereits gut bekannt. Abb.1 skizziert wesentliche Strukturen im Bienegehirn. Auf jeder Antenne befinden sich 60000 vor allem cholinerge olfaktorische und chemotaktische Rezeptorneurone (ORN). Die ORN weisen ein breites Antwortspektrum auf

verschiedene Düfte auf (Akers & Getz, 1993). Sie ziehen als Antennalnerv gebündelt über beide Antennen in die Kopfkapsel, wo sie sich in 6 verschiedene Trakte T1-T6 aufspalten (Arnold *et al.*, 1985; Suzuki, 1975). Die Trakte 1-4 projizieren dabei in die erste olfaktorische Verarbeitungsstation im Bienenhirn, den Antennallobus (AL), eine paarige Struktur. Der AL ist ein strukturelles und funktionelles Analogon zum olfaktorischen Bulbus der Vertebraten. Der AL ist dabei eine sphärische Struktur, die sich wiederum aus je 156 Glomeruli zusammensetzt (Flanagan & Mercer, 1989; Galizia *et al.*, 1999b). Die 4 genannten Trakte innervieren dabei zugehörige Gruppen von Glomeruli, wobei die ORN jeweils nur einen Glomerulus innervieren. Innerhalb der Glomeruli verschalten sie auf ein Netzwerk von 3700 lokalen Interneuronen (LIN) und 800 Projektionsneuronen (PN) (Abel *et al.*, 2001). Insgesamt ist hier also eine starke Konvergenz gegeben, was auf eine Integration der Geruchsinformation hindeutet. Die LIN greifen multiglomerulär ab und sind in ihrer Ausdehnung auf den AL beschränkt. Sie werden in 2 Klassen unterteilt. Heterogene LIN verfügen über Dendriten in 65-90 Glomeruli, wobei die dendritischen Verzweigungen in jeweils einem Glomerulus stärker ausgebildet sind. Homogene LIN sind in 60-100 Glomeruli gleich dicht verzweigt. 20% der LIN sind GABA-immunoreaktiv. (Schäfer & Bicker, 1986). LIN bekommen sowohl von ORN als auch PN und anderen LIN Eingänge (Malun, 1991). Die PN leiten die Information des AL an weitere Zentren im Gehirn. Sie lassen sich in 3 Klassen einteilen, die über die 3 verschiedenen Trakte definiert sind, über die sie den AL verlassen:

mACT-PN verlassen den AL über den medianen antenno cerebralis Trakt, lACT-PN über den lateralen antenno cerebralis Trakt und mlACT-PN über den median lateralen antenno cerebralis Trakt. mlACT-PN greifen dabei multiglomerulär im AL ab und ziehen über den mlACT in das laterale Protocerebrum. Sie greifen im AL vor allem in den durch die Antennentrakte T1 und T3 innervierten Glomeruli ab. lACT-PN und mACT-PN sind jeweils uniglomerulär und projizieren über den lACT bzw. mACT in das laterale Protocerebrum und in den Pilzkörper (MB). lACT-PN innervieren hauptsächlich die T1-Region im AL, während mACT-PN aus den durch die Trakte T2, T3 und T4 innervierten Glomeruli abgreifen (Abel *et al.*, 2001). Zwischen PN und LN gibt es wechselseitige Verbindungen (Malun, 1991).

Der MB, der Eingang von den PN aus mACT und lACT erhält, nimmt als ebenfalls paarige Struktur einen großen Teil des Hirns ein (Mobbs, 1985). Ein MB setzt sich aus je ca. 170000 Kenyonzellen (KC) zusammen, die parallel angeordnet sind. Dabei bildet der Calyx den Eingangsbereich, welcher in 3 konzentrische Bereiche gegliedert ist. Außen befindet sich die Lippe, die Eingänge der olfaktorischen Bahnen mACT und lACT bekommt. Den 2. Bereich bildet der Kragen mit Eingängen vom optischen System und als 3. Segment der basale Ring, der sowohl vom optischen als auch vom olfaktorischen System Eingänge erhält (Rybak *et al.*, 1994). Die Axone der KC ziehen in Form des Pedunculus aus dem Calyx und spalten sich danach in 2 Ausgangsregionen des MB auf, den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lobus. In diesen Ausgangsbereichen erfolgt eine Transformation der konzentrischen Eingangsbereiche auf bandenähnliche Strukturen. Aus diesen greifen wiederum verschiedene Klassen von Ausgangsneuronen ab, die sowohl in andere Hirnbereiche als auch teilweise rückkoppelnd zum Calyx projizieren (Grünewald, 1995; Rybak & Menzel, 1993).

Das laterale Protocerebrum zeigt keine morphologisch erkennbare Struktur. Aus diesem Grund existieren bislang kaum Untersuchungen zur Funktion, wenngleich ihm anhand der Informationseingänge aus AL und MB bei der Duftprozessierung eine wichtige Rolle zukommen dürfte.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gehirns der Honigbiene mit den farblich markierten Bereichen des olfaktorischen Systems. Die olfaktorische Information wird mit den Antennen aufgenommen und über den Antennalnerv zu den Antennalloben weitergeleitet. Die prozessierte Information wird danach über verschiedene Trakte an das laterale Protocerebrum und den Pilzkörper weitergegeben. AL: Antennallobus, LC: Lateraler Calyx, MC: Medianer Calyx, Pe: Pedunkulus,  $\alpha$ :  $\alpha$ -Lobus,  $\beta$ :  $\beta$ -Lobus SOG: Sub-oesophageales Ganglion, OC: Ocellen, LO: Lobula, ME: Medulla**

### **1.2.5 Kodierung olfaktorischer Information und neuronale Plastizität durch assoziatives Lernen im olfaktorischen System von Insekten**

Über die Funktion von AL und MB und ihres jeweiligen Analogons in Vertebraten, des olfaktorischen Bulbus (OB) und des olfaktorischen Kortex (OC) bei der Duftprozessierung ist bereits vieles bekannt. So konnte mit Hilfe von calcium imaging-Verfahren gezeigt werden, dass bei Honigbienen (Galizia *et al.*, 1999a) und bei *Drosophila* (Wang *et al.*, 2003) stets dieselben duftspezifischen glomerulären Erregungsmuster im AL bestehen, weshalb man dem AL eine zentrale Rolle bei der Kodierung und Repräsentation von Düften im Gehirn der Insekten zuweist (Hansson & Anton, 2000). Die Aktivitätsmuster im AL der Honigbiene konnten dabei durch gezielte Färbungen auf die Aktivität der PN zurückgeführt werden (Sachse, 2002). Intrazellulärableitungen an PN und LIN im AL der Biene ergaben bei Duftstimulation komplexe Antwortmuster und zeigten, dass das Antwortspektrum bei verschiedenen

Neuronen individuell ist (Abel, 1997;Müller, 2000), was auch ihre Einbettung in das Netzwerk aus exzitatorischen und inhibitorischen Verschaltungen zwischen PN und LIN reflektieren dürfte. Müller (Müller *et al.*, 2002) konnte bei der Biene zudem zeigen, dass sich auch die PN des mACT und lACT in ihren Antwortspektren voneinander unterscheiden; so zeigen die PN des lACT ein breiteres Aktivitätsprofil für unterschiedliche Düfte als PN des mACT, die Düfte eher durch Latenzunterschiede oder spezifische inhibitorische Phasen in Kombination mit exzitatorischen Phasen kodieren.

Elektrophysiologische Studien an der Heuschrecke *Schistocerca americana* (Perez-Orive *et al.*, 2002a) und imaging-Experimente in *Drosophila* (Wang *et al.*, 2004) und der Honigbiene (Szyszka, 2005;Szyszka *et al.*, 2005) ergaben, dass es, anders als bei der Konvergenz der ORN auf die Glomeruli des AL, eine starke Divergenz der PN auf KC im Calyx des MB gibt, wobei im Fall der Honigbiene die 800 PN auf etwa 60000 KC verschalten. KC antworten viel duftspezifischer und zudem mit weniger Aktionspotentialen als PN (sparse coding); somit unterscheidet sich die neuronale Ensemblerepräsentation im MB deutlich von der im AL.

Eine mögliche funktionelle Bedeutung der auftretenden duftinduzierten Oszillationen im Feldpotential in AL und MB ist stark umstritten. So wird vorgeschlagen, dass eine globale, durch die exzitatorisch-inhibitorischen Verschaltungen von PN und LIN im AL erzeugte LFP-Oszillation als Referenz für die transiente Synchronisation verschiedener PN pro Oszillationszyklus dient und Duftkodierung im AL in einer duftspezifischen Abfolge transientser Synchronisierung von einzelnen PN-Verbänden realisiert wird ( Laurent *et al.*, 1994, 1996). Eine andere Möglichkeit ist, dass die langsameren neuronalen Antwortmuster im AL, die sich in den Aktionspotentialverläufen niederschlagen, eher für die Kodierung der Duftidentitäten verantwortlich sind, während die schnelleren Oszillationen dazu dienen sollen, durch rhythmische Synchronisierung dynamischer PN- Ensembles die Transformation von AL-spezifischer Ensemblerepräsentation zum sparse coding der KC zu ermöglichen (Laurent, 2002).

Die Oszillationen als solche entstehen vermutlich durch das Zusammenspiel exzitatorischer PN und inhibitorischer, GABAerger LIN im AL (Stopfer *et al.*, 1997c). Einige experimentelle Daten von *Schistocerca americana* (Perez-Orive *et al.*, 2002b) und von der Honigbiene (Stopfer *et al.*, 1997b) unterstützen die obige These, während Studien an *Manduca sexta* keine Korrelationen zwischen PN-Aktivität und Feldpotentialoszillation ergaben (Christensen *et al.*, 2000;Christensen *et al.*, 2003b).

Was ist nun über die Funktion der verschiedenen Neuropile des olfaktorischen Systems bei Insekten, insbesondere der Honigbiene, bei assoziativen Lernprozessen bekannt?

Einen Hinweis für die Beteiligung von AL, MB und lateralem Protocerebrum an olfaktorischem Lernen lieferte ein aus dem Unterschlundganglion der Biene aufsteigendes identifiziertes Neuron (VUMmx1). Es reagiert mit erhöhter Aktivität auf die Zuckerwasserstimulation auf Antennen und Rüssel und innerviert stark alle 3 genannten Neuropile, womit eine Konvergenz zwischen olfaktorischer und gustatorischer Bahn gegeben ist. Hammer (Hammer, 1993) konnte zeigen, dass dieses Neuron in einem Konditionierungsexperiment sowohl die Funktion des Repräsentators als auch die des Verstärkers des US (Zuckerwasser) innehat. Der vermutliche Neurotransmitter des VUMmx1 ist Oktopamin (Kreissl *et al.*, 1994). Lokale Injektion von Oktopamin in AL und MB der Honigbiene reichte aus, um

Bienen auf Düfte zu konditionieren (Hammer & Menzel, 1998), wobei sich die Akquisition der Rüsselreflexkonditionierung in beiden Neuropilen unterschied. Müller (Müller, 1996a; Müller, 2002a; Müller, 2002b) konnte zudem zeigen, dass Oktopamin im AL, nicht aber im MB, zu einem vorübergehenden Anstieg der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) führt, einem Prozess, der notwendig zur Induzierung von Langzeitgedächtnis ist.

Bei einem weiteren Experiment wurden AL und MB der Honigbiene nach einer Konditionierung kurzzeitig gekühlt (Erber, 1980; Menzel *et al.*, 1974). In beiden Neuropilen führte die Kühlung zu einer retrograden Amnesie, wobei auch hier in unterschiedlichem Maße. Die Kühlung des AL war in einem Zeitintervall von 3 Minuten nach einer CS/US-Paarung verhaltenswirksam, während das Zeitintervall bei der Kühlung des MB 7 Minuten betrug. Genetische Studien an *Drosophila* erbrachten darüber hinaus, dass Mutanten mit defekter MB-Struktur Defizite in ihren Lernleistungen während olfaktorischer Konditionierungen zeigten (Heisenberg *et al.*, 1985). Diese Ergebnisse weisen alle auf eine Involvierung von AL/MB in assoziative Lernprozesse hin, weisen zusätzlich aber auch darauf hin, dass es Unterschiede in der funktionellen Bedeutung zwischen AL und MB geben könnte.

Interessant für lernspezifische *Ensemble-Veränderungen* in den AL sind weitere 3 Experimente. Faber (Faber, 1999) paarte eine klassische differentielle Konditionierung an der Honigbiene mit calcium imaging-Messungen und konnte einen Anstieg der Kalziumsignalantwort auf den belohnten Duft in einigen Glomeruli nach der Konditionierung messen, obwohl die genaue neuronale Herkunft in den AL unbestimmt blieb. Daly (Daly *et al.*, 2004) paarte klassische Konditionierung auf Düfte bei *Manduca sexta* mit extrazellulären Multielektrodenableitungen im AL und beobachtete für den belohnten Duft eine Neurekrutierung neuer „units“ (gesortete Neurone) um ca. 50%. Diese units werden als PN gedeutet. Zusätzlich zeigten viele der units eine Umstrukturierung ihrer Antwortcharakteristik. Schließlich konnte Yu (Yu *et al.*, 2004) zeigen, dass im AL von *Drosophila* als Folge einer Konditionierung mit einem Duft als CS und einem elektrischen Schock als US duftspezifisch neue Glomeruli rekrutiert werden. Alle diese Experimente weisen auf eine Umstrukturierung des AL-Netzwerkes als Folge des assoziativen Lernens und das Anlegen einer Gedächtnisspur hin, wobei der Mechanismus noch unklar bleibt.

Über Ensembleveränderungen im MB ist weniger bekannt, da sich KC durch ihre Kleinheit direkten intrazellulären oder extrazellulären Messungen entziehen. Eine Paarung von differentieller Duftkonditionierung mit Optical imaging -Registrierungen an den clawed KC (Strausfeld, 2002) der Honigbiene, einer Subpopulation von an der Lippe der Calyces abgreifenden KC, ergaben hier eine für den belohnten Duft relativ stärkere Antwort als für den unbelohnten Duft (Szyszka, 2005).

Auf der Ebene MB-*extrinsischer* Neurone wurde ebenfalls lernspezifische Plastizität nachgewiesen. Im Fall der Honigbiene ist dabei besonders ein im Pedunkulus der MB abgreifendes extrinsisches Neuron, das PE1, untersucht worden. Dieses Neuron verbindet MB und laterales Protocerebrum. Mauelshagen (Mauelshagen, 1991b; Mauelshagen, 1993a) zeigte, dass es mit erfahrungsabhängiger Modulation seines Antwortverhaltens reagiert und insbesondere nichtassoziative und assoziative Plastizität unterschiedlich repräsentiert. Hier führte Sensitisierung zu einer Erhöhung, Konditionierung zu einer Verringerung der relativen Antwortfrequenz. Menzel (2005) konnte zum ersten Mal bei Insekten für einige intrazelluläre PE1-Ableitungen assoziative LTP zeigen, indem er eine presynaptische Tetanusreizung mit einer Depolarisierung des PE1 paarte (persönl. Mitteilung Prof. Menzel). Grünewald (Grünewald, 1995; Grünewald, 1999) untersuchte das Antwortverhalten  $\alpha$ -Lobus

extrinsischer Feedbackneurone, welche zurück zu den MB Eingangsbereichen projizieren. Einmalige CS-US Paarungen ergaben hier eine kurzzeitige Verringerung der Antwortstärke. In Hinblick auf die Rückkopplungen und vielfältigen Projektionsgebiete dieser Neurone, die ungeklärte Funktion des lateralen Protocerebrums und die Vernetzungen der genannten Neuropile untereinander ist eine Interpretation der Bedeutung der einzelnen Veränderungen infolge assoziativen Lernens aber schwierig.

### **1.3 Ziele der Arbeit**

Die bisher genannten Beispiele belegen neuronale Plastizität infolge assoziativen Lernens in den Neuropilen AL und MB des olfaktorischen Systems der Insekten und insbesondere auch der Honigbiene.

Der Vorteil der für diese Arbeit verwendeten Multielektroden liegt darin, dass die elektrische Aktivität mehrerer Neurone eines Ensembles gleichzeitig registriert werden kann. Deshalb eignet sich diese Methode auch gut dazu, neuronale Plastizität in Ensembles zu untersuchen. Im Fall der Honigbiene mit ihrem besonders reichhaltigen Verhaltensrepertoire, die sich besonders gut als Modellsystem für die Untersuchung von neuronaler Plastizität infolge assoziativen Lernens eignet, existieren bislang nur Untersuchungen auf Einzelzellebene bzw. mit optical imaging-Verfahren. Beide Methoden lösen jeweils nur einen Bereich- zeitlich oder räumlich - ausreichend auf. Multielektroden vereinen die Vorteile beider Methoden in sich. Ausgehend von den bereits bekannten lernspezifischen Veränderungen in AL und MB können mit Hilfe dieser Technik also folgende Fragen gestellt werden:

Tritt Plastizität infolge einer klassischen Konditionierung im olfaktorischen System der Honigbiene, insbesondere in AL und MB, auch auf der Ebene lokaler neuronaler Ensembles auf?

Wie unterscheidet sich die Ensemblerepräsentation für einen belohnten Duft von der eines unbelohnten Duftes?

Ist die Plastizität überhaupt ensemblespezifisch, d.h. muss man das Zusammenspiel mehrerer Neurone betrachten, um eine angelegte Lernspur verfolgen zu können, die auf Einzelzellebene nicht sichtbar ist?

Treten auf Ebene neuronaler Ensembles Unterschiede lernspezifischer Veränderungen zwischen AL und MB-Ausgang auf?

Steht lernspezifische Plastizität im olfaktorischen System der Honigbiene mit oszillatorischer Feldpotentialaktivität in Verbindung?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der multiplen Extrazellulärableitungen im Gehirn der Honigbiene etabliert. Dies bedeutet, dass Ensemblerepräsentationen von Düften in den Neuropilen charakterisiert und mit Einzelzelleitungen und dem optical imaging verglichen wurden. Fragen, die sich hier stellten, waren:

Wie sieht eine Ensembleantwort auf einen Duft aus? Werden beispielsweise die Ergebnisse des optical imaging bestätigt und sind bestehen Ensembleantworten in einem AL aus duftspezifischen Kombinationen einzelner Glomeruli, d.h. aus der Kombination einzelner Neurone?

Welche Grenzen hat die Methode der Ableitung mit Multielektroden? Welche Probleme treten auf?

Auf diese Fragen soll im Folgenden detaillierter eingegangen werden. Die Arbeit gliedert sich dabei in folgende Bereiche auf: Ausgehend von der differentiellen Konditionierung als ein Experiment zur Untersuchung assoziativen Lernens werden neuronale Ensembles in AL und  $\alpha$ -Lobus-Bereich ( $\alpha$ -L) des MB getrennt voneinander registriert und später miteinander verglichen. Für beide Ableitorte folgt zunächst eine allgemeine Charakterisierung sowohl der Spikeaktivität als auch der Feldpotentialaktivität. Daran schließt sich dann die Untersuchung lernspezifischer Veränderungen an.