

3 Ergebnisse: MUA-Antworten im AL

Die Gesamtzahl der Tiere, an denen eine differentielle Konditionierung bei gleichzeitiger Messung neuronaler Aktivität mit Multielektroden im AL durchgeführt wurde, betrug 40. Davon kamen für eine Auswertung der MUA-Aktivität jedoch nur 23 in Betracht. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen hatte ein Verrutschen der Elektroden während des Experiments den Verlust oder zumindest die Verschiebung der Signalverteilung auf den Spikekanälen zur Folge. Dies geschah entweder durch Kopfbewegungen des Tieres oder dann, wenn nicht genügend lange Zeit gewartet wurde, bis eine feste Umschließung der Elektroden mit dem umgebenden Gewebe und damit eine Stabilisierung der Ableitposition eingetreten war. Desweiteren konnten durch Muskelaktivität ausgelöste elektrische Störsignale die neuronale Aktivität überlagern. Auch dies schien mit der Isolierung der Elektroden durch das umgebende Gewebe korreliert zu sein. Häufig verschwanden registrierte Muskelpotentiale ca. 20 Minuten nach Positionierung der Elektroden völlig oder traten zumindest schwächer auf. Feuchte Gehirne, die besonders oft bei jungen Tieren beobachtet wurden, führten ebenfalls zu einer Verschlechterung der Signalqualität und insbesondere zu kleinen Signalamplituden. Da die Schafte bei Eindringen in das Gewebe beträchtliche Verletzungen des Gewebes verursachten, kann in diesem Fall Hämolymp-Flüssigkeit an die Ableitstellen vorgedrungen sein und eine niederohmige Brücke zwischen Ableitelektrode und Referenzelektrode verursacht haben, was zu einer Verringerung der gemessenen Spannung führt. Auch die Entfernung zwischen den Elektroden und abgeleiteten Neuronen war ein Faktor, der das Signal-Rausch-Verhältnis erheblich beeinflusst hat.

3.1 Häufigkeitsverteilung der Düfte

Idealerweise sollten die Düfte über die gesamten Experimente ausbalanciert sein, d.h., jeder Duft sollte gleich häufig als CS+, CS- und Ctrl präsentiert worden sein. Es war jedoch schwierig, neuronale Antworten auf alle Düfte zu bekommen, da in jedem Experiment das abgeleitete Ensemble ein anderes war. Abb.9 zeigt die Häufigkeitsverteilung der verwendeten Düfte im AL.

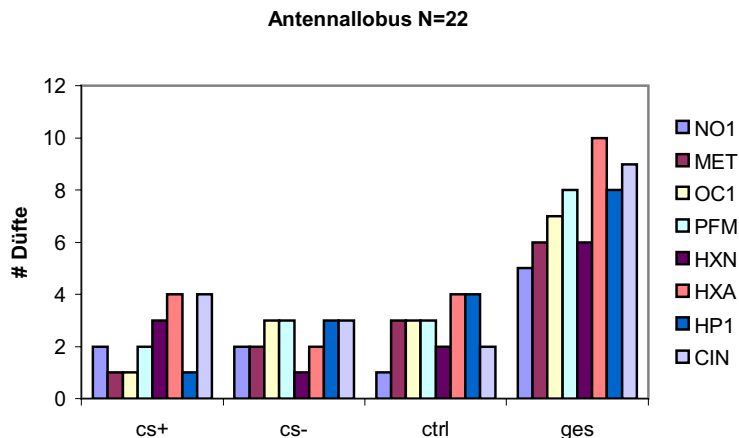


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der verwendeten Düfte über alle Tiere

3.2 Charakterisierung der MUA-Antworten

3.2.1 Klassifizierung der Antworttypen

Die allgemeinen Klassifizierungen der MUAs beziehen sich im Folgenden immer auf die Prekonditionierungsphase der Lernexperimente oder auf Duftgaben außerhalb der Lernexperimente, um die Beschreibung der Antworten nicht mit lernspezifischen Veränderungen zu vermischen. Die Länge der Duftstimuli betrug stets 1 s.

In den 23 ausgewerteten Tieren wurden insgesamt 110 MUAs untersucht. Im Mittel wurden pro Tier dabei 4 MUAs aus den Rohdaten extrahiert. Ein typisches Beispiel für eine Ableitung im AL ist in Abb.10 gezeigt.

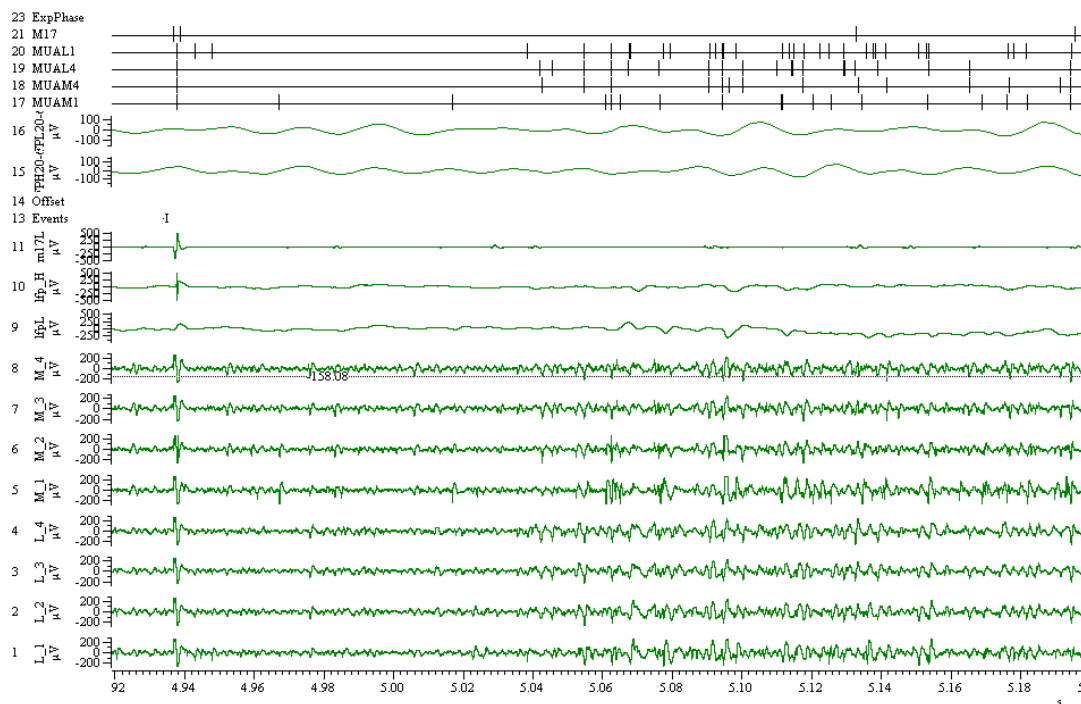


Abbildung 10: Beispiel für eine Duftantwort im AL. Die unteren 8 Kanäle entsprechen den Spikekanälen der 8 Ableitelektroden auf 2 Schäften und sind zwischen 300 und 6000 Hz gefiltert. . Darüber sind 2 LFP-Kanäle zu sehen, die in einem Filterbereich zwischen 10 und 125 Hz das LFP registriert haben und denselben Elektroden wie der 1. und 4. Spikekanal (von unten) entsprechen. Auf den darüberliegenden Kanälen ist die M17-Aktivität zu erkennen sowie dieselben Feldpotentialregistrierungen wie unten in einem Filterbereich zwischen 20 und 60 Hz. Die obersten Kanäle schließlich repräsentieren die aus den Spikekanälen extrahierten Spikezeitpunkte. Beginn und Ende einer Duftstimulation waren jeweils mit Buchstaben markiert, wie an dem „I“ aus der Abbildung ersichtlich, das den Stimulusbeginn anzeigt. Dort ist auch ein Schaltartefakt zu erkennen, welches durch das Schalten der Magnetventile der Duftapparatur verursacht wurde und sich auf jeden Kanal übertrug

Peri-Stimulus-Zeit-Histogramme (PSTH) dienen nun im weiteren Verlauf zur Klassifizierung von MUA-Duftantworten. Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele typischer Antwortcharakteristik. Jedes Bild entspricht dabei einer MUA-Duftantwort auf jeweils verschiedene Düfte, wobei jedes PSTH für jeweils 3 aufeinanderfolgende Applikationen desselben Duftes erstellt wurde.

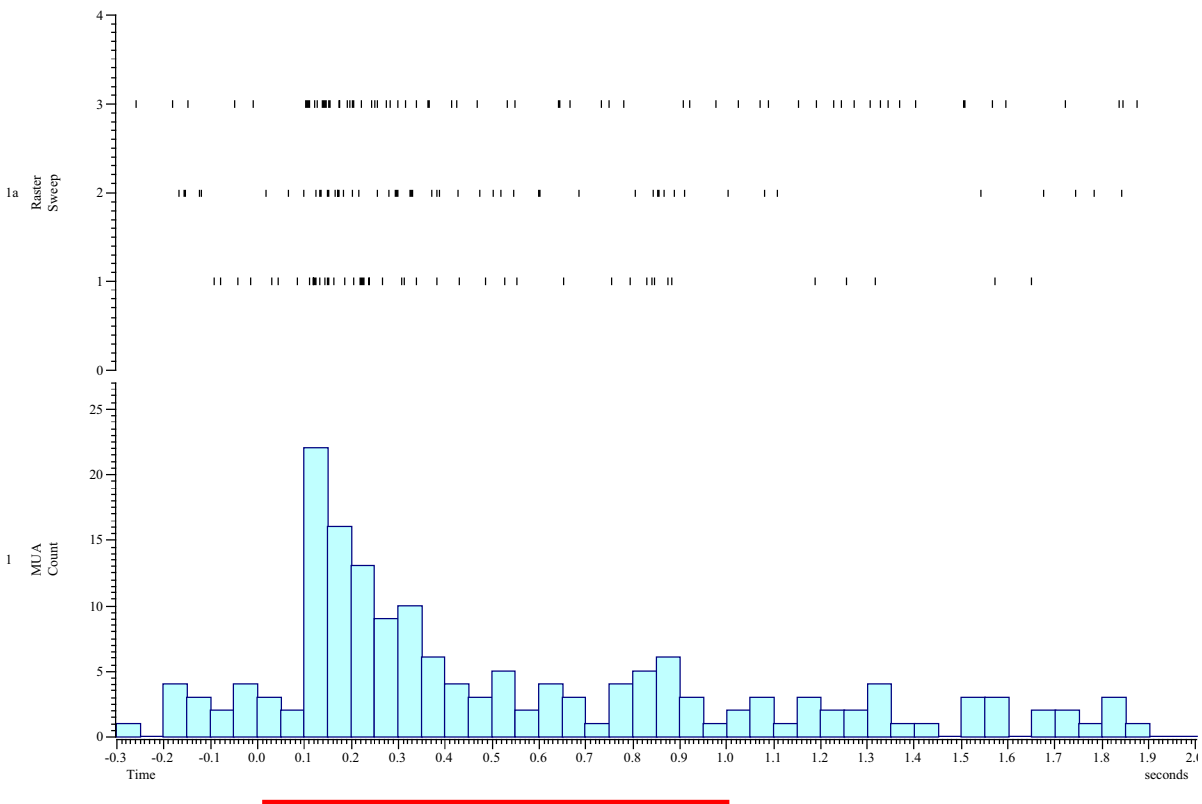


Abbildung 11: Ratenantwort einer exzitatorischen MUA-Antwort (Stimulus: 2-Heptanon). Die Raster-Plot-Darstellung der Spikezeitpunkte ist in der oberen Bildhälfte zu sehen. Zeitpunkt 0 markiert jeweils den Beginn der Stimulation; die Stimulationsdauer betrug 1 Sekunde. Die Zeitbins betragen 50 ms. Die rote Linie markiert die Dauer der Duftgabe

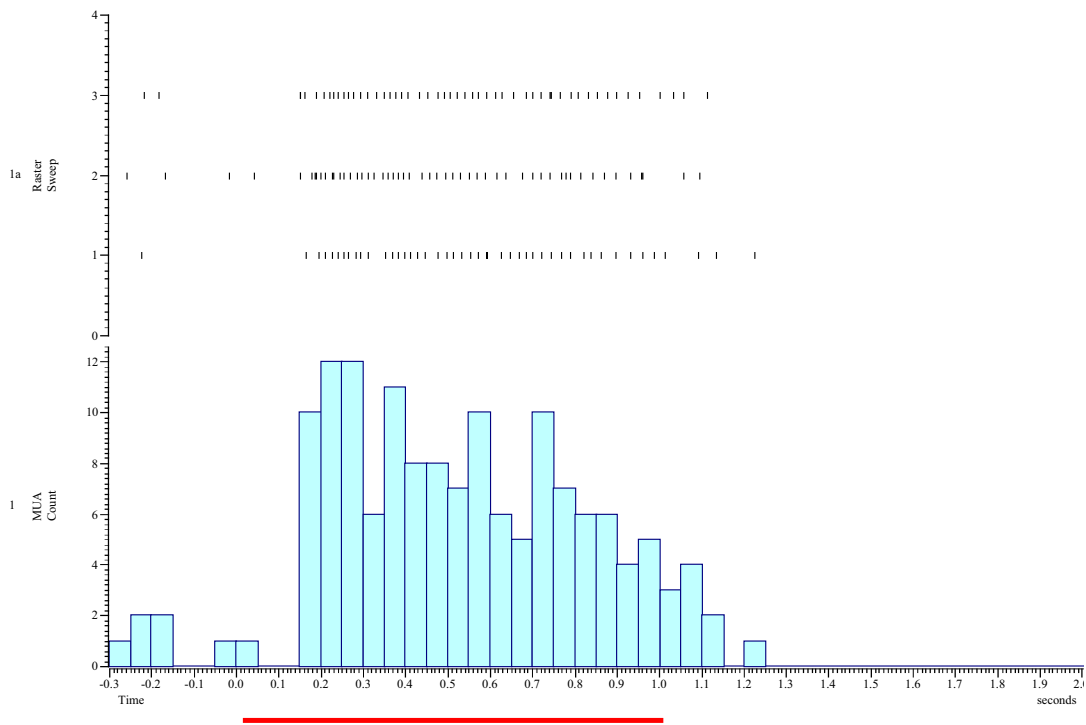


Abbildung 12: Ratenantwort einer exzitatorischen MUA-Antwort (Stimulus: Pfefferminze)

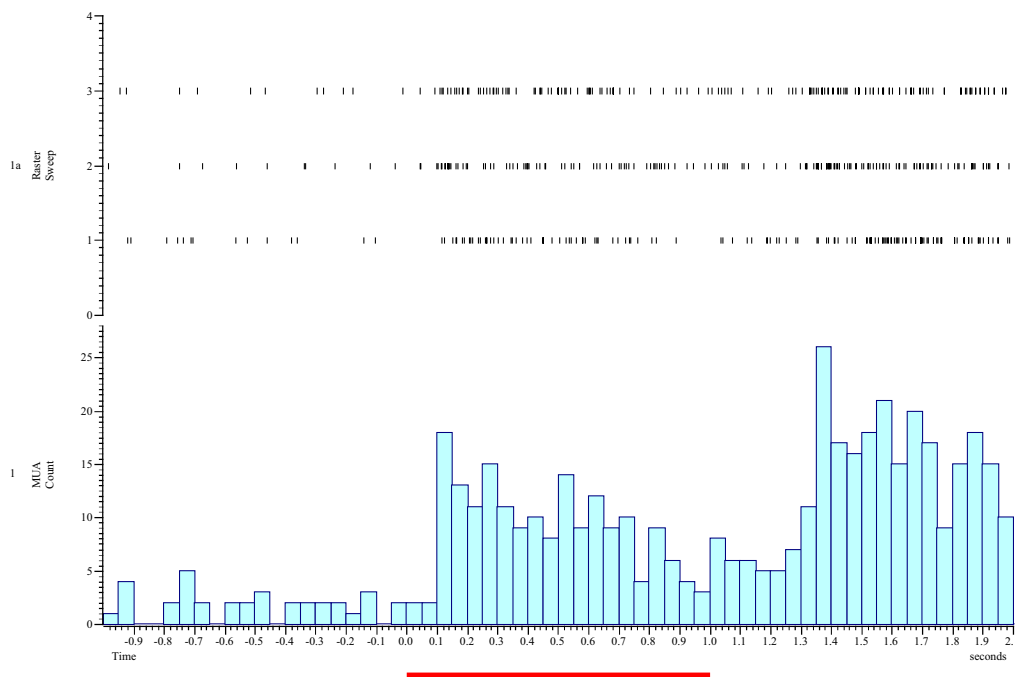


Abbildung 13: Ratenantwort einer exzitatorischen MUA-Antwort mit Off-Anteil nach Ende der Stimulation (Stimulus: Methylsalicylat)

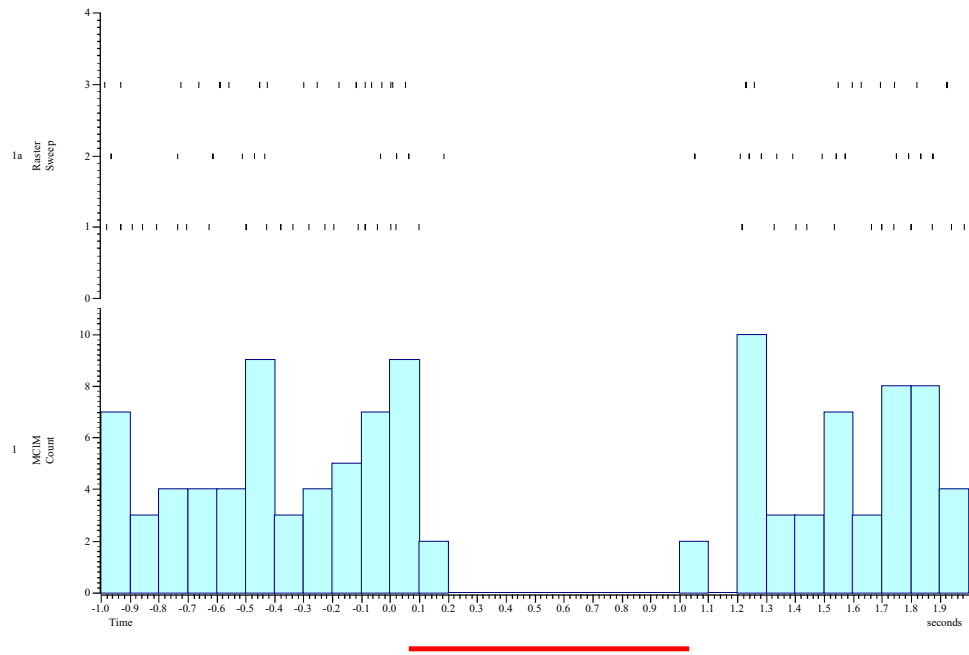


Abbildung 14: Ratenantwort einer inhibitorischen MUA-Antwort (Stimulus: 1-Octanol)

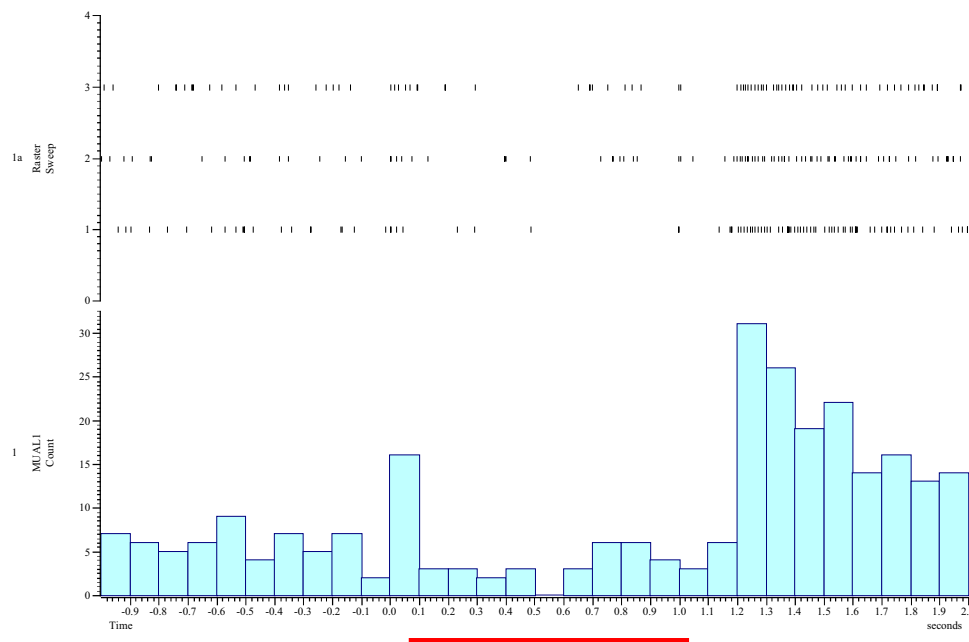


Abbildung 15: Ratenantwort einer MUA-Off-Antwort /exitatorisch nach Stimulusende (Stimulus: Cineol)

Die Antwortcharakteristik (exzitatorisch/inhibitorisch/keine Antwort) einer MUA auf unterschiedliche Düfte variierte von sehr ähnlich bis stark unterschiedlich, so dass hier keine Regel abgeleitet werden konnte. In 7% der Fälle reagierte eine MUA selektiv auf nur einen oder zwei der 3 präsentierten Düfte. Die Antwort verschiedener MUAs auf denselben Duft sowohl im selben Tier als auch bei verschiedenen Tieren war unterschiedlich. Somit konnte auf MUA-Ebene weder eine generelle Duftspezifität noch eine MUA-Spezifität der Antwortklassen beobachtet werden.

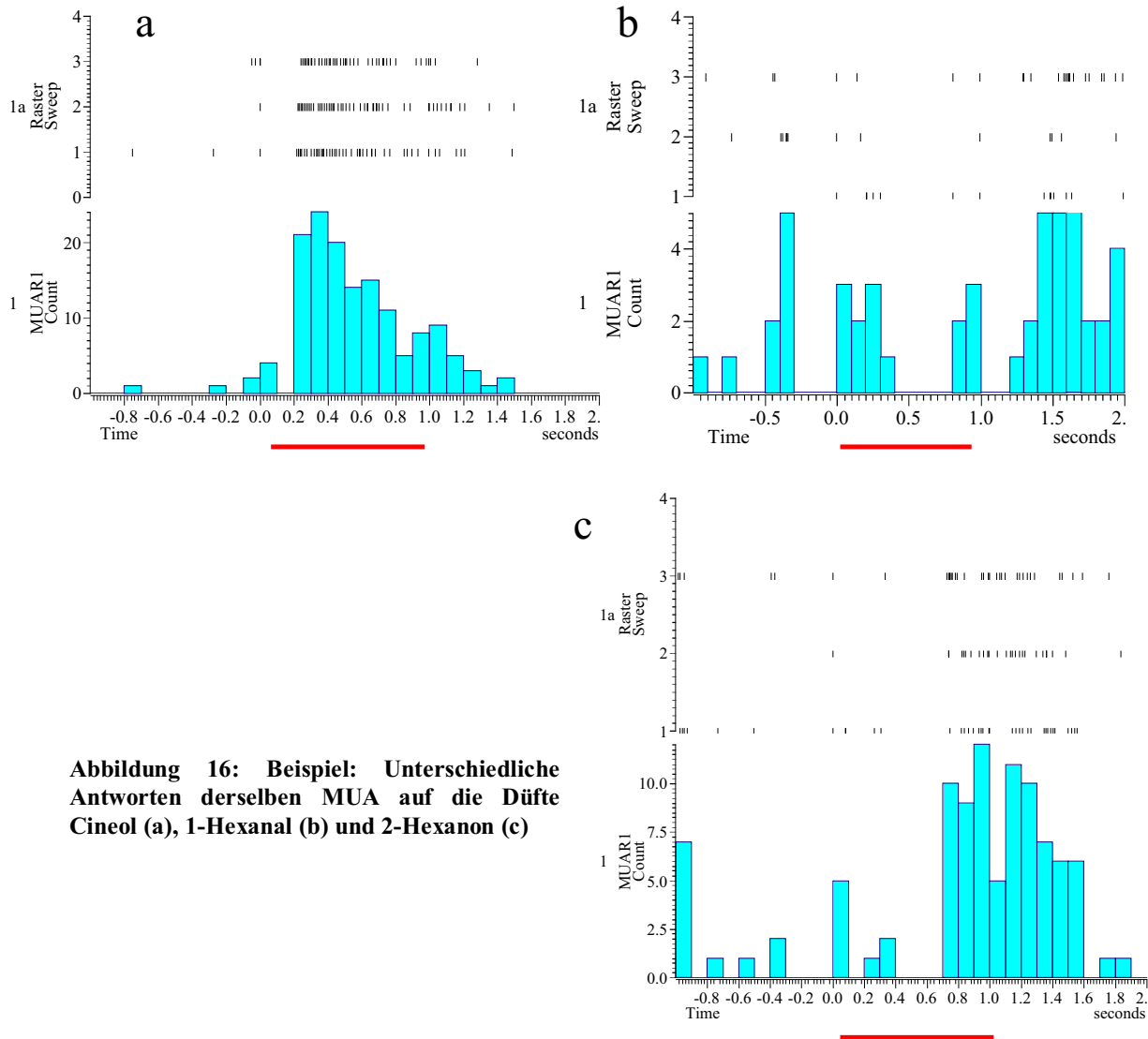


Abbildung 16: Beispiel: Unterschiedliche Antworten derselben MUA auf die Düfte Cineol (a), 1-Hexanal (b) und 2-Hexanon (c)

Zur besseren Charakterisierung wurde der Antwortverlauf in 3 Zeitfenster unterteilt und klassifiziert: Für die ersten 500 ms der Antwort, die zweiten 500 ms der Antwort und für 500 ms nach Ende der Duftstimulation.

Ein Vergleich der Häufigkeiten der 3 Duftantwortklassen „Exzitatorisch“ (Spikerate übersteigt Spontanaktivitätsniveau), „Inhibitorisch“ (Spikerate fällt unter Spontanaktivitätsniveau) und „Keine Antwort“ (Spikerate bleibt auf Spontanaktivitätsniveau) zeigt, dass die Mehrzahl der Antworten in den ersten 500 ms der Duftstimulation ungeachtet der Duftidentität exzitatorisch waren, ihr Anteil in den zweiten 500 ms jedoch abnahm. Diese Verteilung zeigte auch nach mehreren Duftstimulationen stets denselben Verlauf.

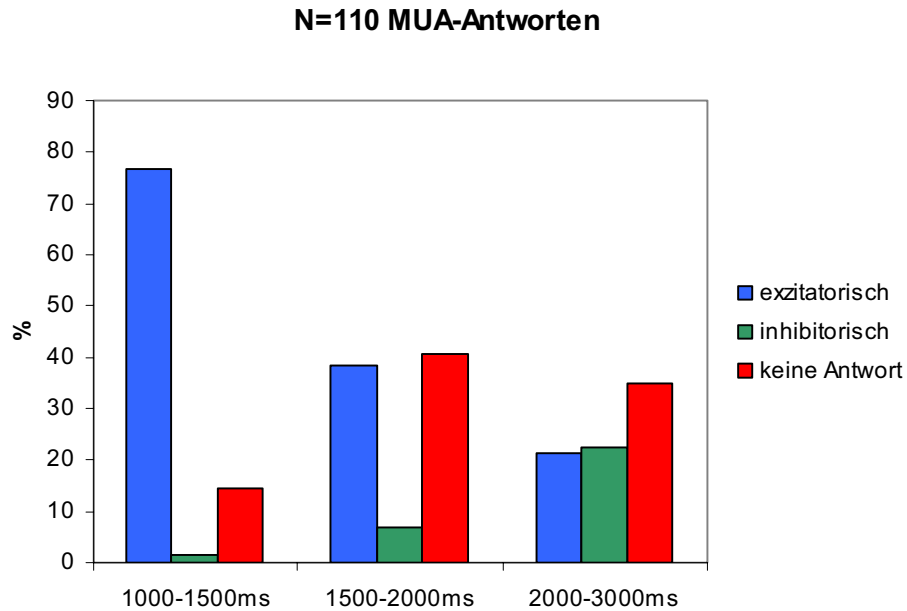


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der verschiedenen Antwortklassen für 3 Zeitfenster während der ersten Duftstimulation in der Prekonditionierung. Summierung über alle 23 Experimente, Stimulusbeginn bei 1000 ms. Für die 2. und 3. Stimulation war dieselbe Verteilung zu beobachten

3.2.2 Mittlere Frequenzen und Onset-Zeiten der Duftantworten

Die obigen Antwortklassen liefern, wie gezeigt, keine eindeutige Stimulusspezifität. Für alle verwendeten Düfte wurden zusätzlich die mittleren Antwortfrequenzen sowie die mittleren Latenzen (Onset-Zeiten) der Duftantworten ermittelt (Mittelung über alle MUAs).

Die mittleren Frequenzen in den ersten 500 ms nach Stimulusbeginn liegen zwischen 45 Hz (1-Heptanol) und 84 Hz (Pfefferminze). In den zweiten 500 ms verringerte sich das Frequenzniveau allgemein auf Werte zwischen 37 Hz (Cineol) und 59 Hz (Pfefferminze),

um nach Ende der Stimulation auf 15-22 Hz abzusinken. Eine nichtparametrische ANOVA (Kruskal-Wallis-Test) ergab eine signifikante Differenz ($p < 0.0001$) der Mittelwerte für den Zeitbereich 0-500 ms nach Stimulusbeginn, wobei die Düfte Pfefferminze und 1-Nonanol mit signifikant höherer Frequenz als 1-Heptanol, 2-Hexanon, 2-Heptanon, 1-Hexanal und Cineol beantwortet werden.

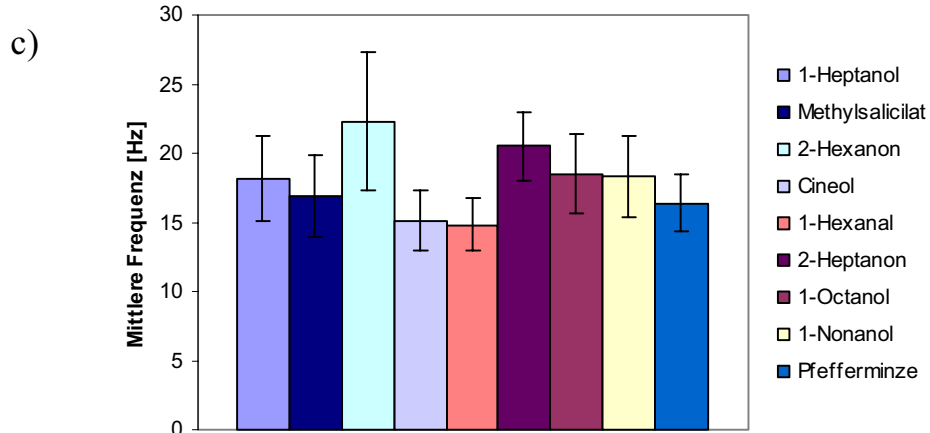
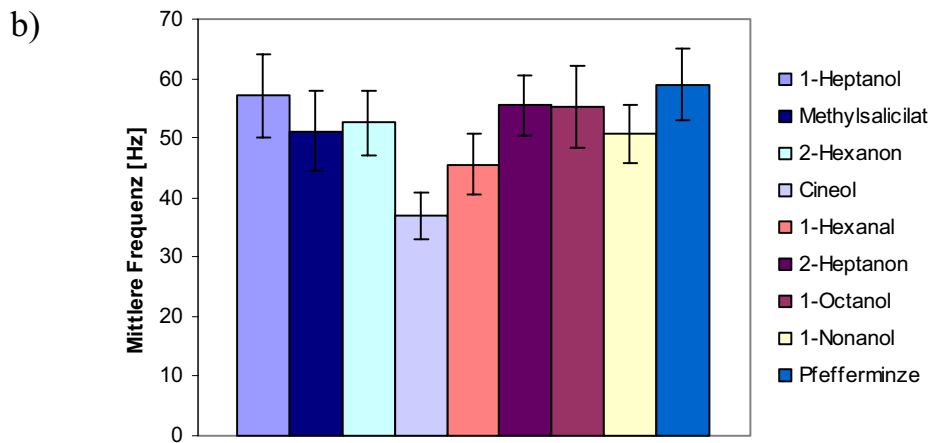
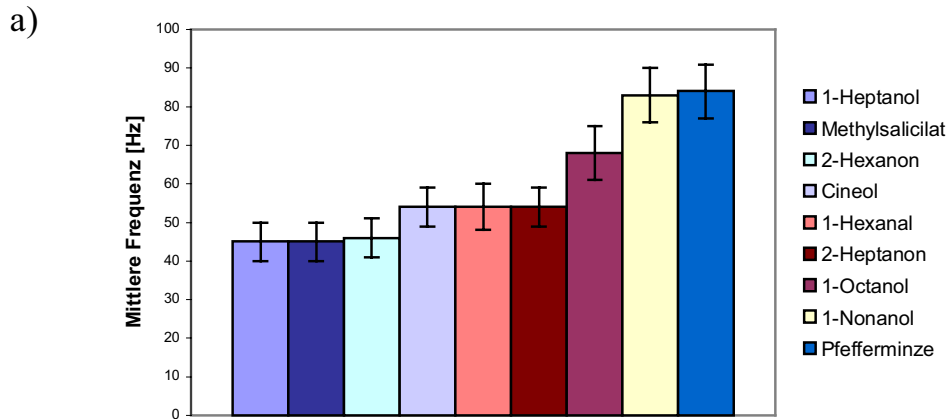


Abbildung 18: Verteilung der mittleren MUA-Antwortfrequenzen über alle MUAs für alle verwendeten Düfte und alle N=23 Tiere für die Zeitbereiche a) 0-500ms, b) 500-1000ms und c) 1000-1500ms nach Beginn der Duftstimulation.

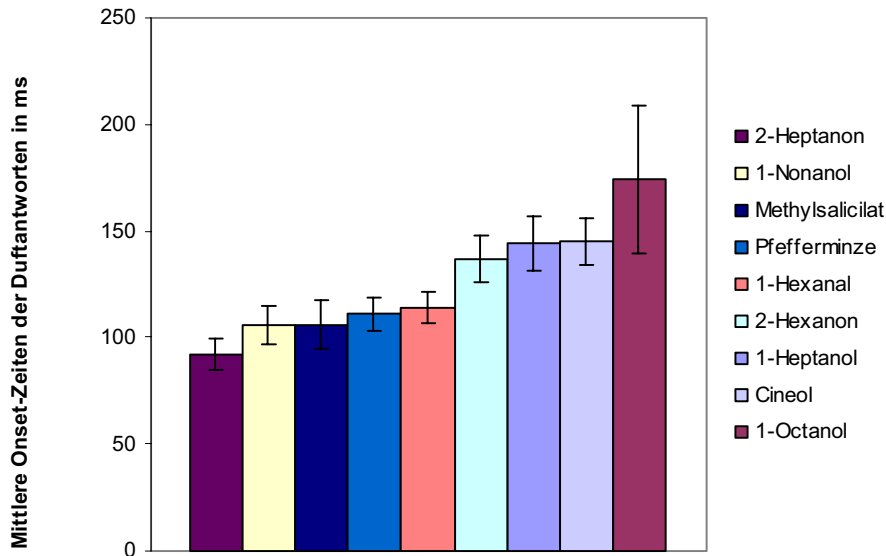


Abbildung 19: Verteilung der mittleren Onset-Zeiten über alle MUAs und alle N=23 Tiere für alle verwendeten Düfte

Für die mittleren Onset-Zeiten ergab sich eine Verteilung zwischen 92 ms (2-Heptanon) und 174 ms nach Beginn der Duftstimulation (1-Octanol). Dabei hat die mittlere Onset-Zeit der MUAs für 2-Heptanon einen signifikant geringeren Wert als für 1-Heptanol, 2-Hexanon und Cineol ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis-Test).

Die hohe Antwortfrequenz für Pfefferminze könnte sich dadurch erklären lassen, dass dieser Duft als Mischung mehrerer Substanzen eine entsprechend weit über den AL verteilte Netzwerkaktivität hervorruft, die sich in der MUA-Registrierung niederschlägt und mehr Neurone pro MUA bedeutet.

Ein Vergleich der hier ermittelten Werte für die Antwortfrequenzen und Onset-Zeiten mit intrazellulären Ableitungen von Projektionsneuronen aus dem AL der Biene (Abel, 1997; Müller, 1999) zeigt für die Frequenzen, dass MUAs einen um ca. 20-30 Hz höher liegenden Wert bei ansonsten gleicher Duftapparatur und Duftkonzentration (Müller) aufweisen. Dies ist natürlich sinnvoll, da sich in einer MUA in der Regel mehrere Neurone befinden. Eine Abschätzung darüber, wie viele Neurone in MUAs beteiligt sein könnten, wird im folgenden Abschnitt gemacht. Für die Onset-Zeiten bzw. Latenzen ergab sich eine gute Übereinstimmung mit den Werten der Intrazellulärableitungen für Projektionsneurone des IACT, während dort mACT-Neurone im Mittel deutlich höhere Latenzen zeigten (289 ms bei Müller). MUAs mit einer solch großen Verzögerung der

Antwort sind nur in Einzelfällen beobachtet worden, zugleich ist aber auch hier ein entscheidender Faktor, dass sich in einer MUA mehrere Neurone befinden können.

3.2.3 MUA- Ensemblerepräsentation

Im Verlauf einzelner MUA-Antworten konnte keine Duftspezifität gefunden werden in dem Sinne, dass alle abgeleiteten MUAs auf denselben Duft mit demselben Erregungsmuster antworteten. Dies veranschaulicht Abb.16. Ebenso zeigte sich das Antwortverhalten einer MUA auf verschiedene Düfte stark individuell. Damit stellt sich die Frage, ob eine eindeutige Duftrepräsentation im Ensemble der aktivierten Neurone liegt, worauf Optical Imaging-Verfahren hindeuten (Joerges *et al.*, 1997), und ob diese Eindeutigkeit auch aus den abgeleiteten MUA-Ensembles abgelesen werden kann. Die Eindeutigkeit der Repräsentation läge dann in einer spezifischen Kombination von neuronalen Erregungsmustern, von denen jedes einzelne Neuron durchaus verschieden auf denselben Duft antworten würde. Schon ein Blick auf die Rohdaten zeigt, dass die abgeleiteten MUA-Ensembles verschiedene Düfte mit individuellen Erregungsmustern beantworten (siehe Abb.23). Zum Zweck der besseren Visualisierung dieses Sachverhaltes wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Daten separat für jedes einzelne Tier durchgeführt. 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.

Als Zeitfenster bzw Bin wurden die ersten 500 ms der Duftstimulation gewählt. Da bei den Tieren eine differentielle Konditionierung durchgeführt wurde, fand in diese Analyse nur die Prekonditionierungsphase Eingang, in der die unterschiedlichen Düfte noch keine belohnungsspezifische Bedeutung haben. So konnte pro Tier die MUA-

Ensemblerepräsentation jeweils dreier unterschiedlicher Düfte visualisiert werden. Jeder der Düfte wurde in dieser Phase dreimal gegeben und somit repräsentieren jeweils 3 Vektorpunkte aufeinander folgende Applikationen desselben Duftes.

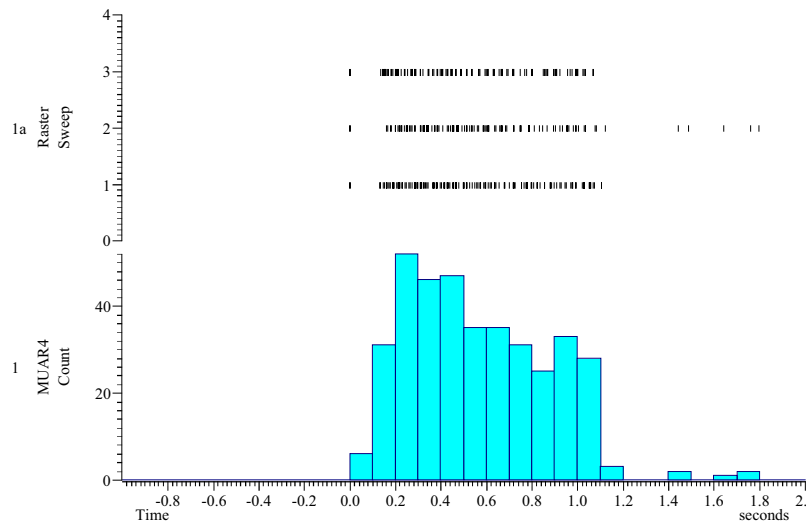
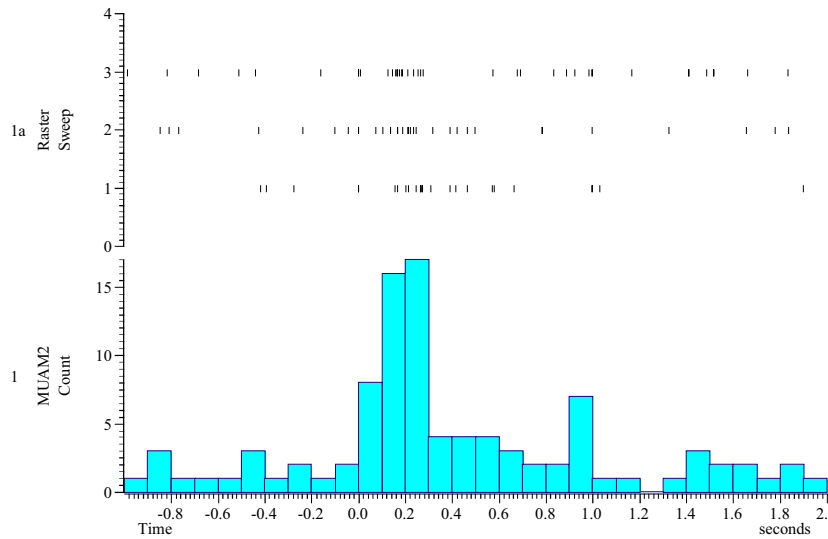


Abbildung 21: Derselbe Duft kann von verschiedenen MUA's verschieden beantwortet werden. 2 Beispiele für den Duft 1-Hexanal aus 2 verschiedenen Tieren

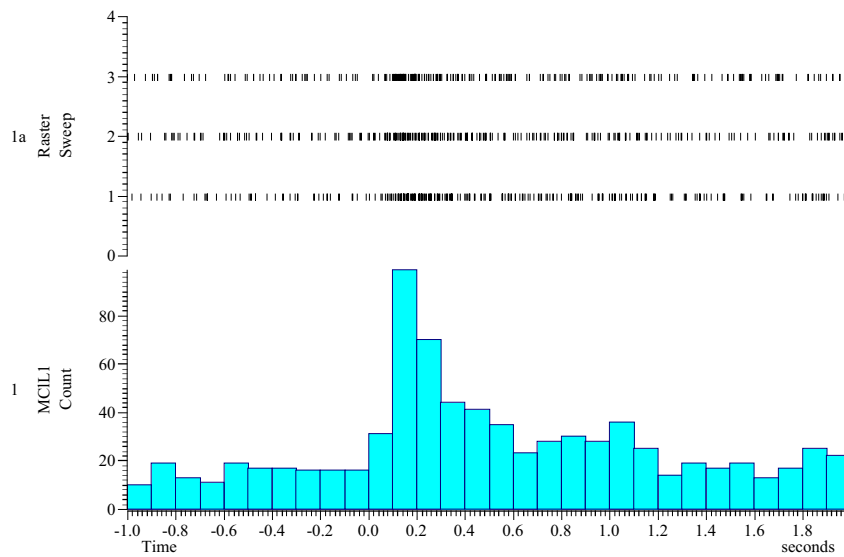
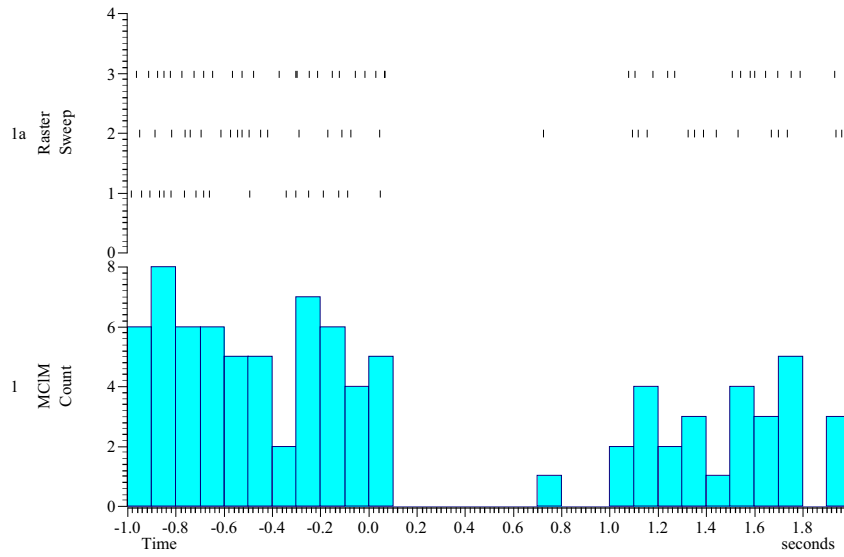


Abbildung 22: In diesem Beispiel antworteten 2 MUAs aus demselben Tier verschieden auf den Duft Pfefferminze: Oben inhibitorisch, unten exzitatorisch

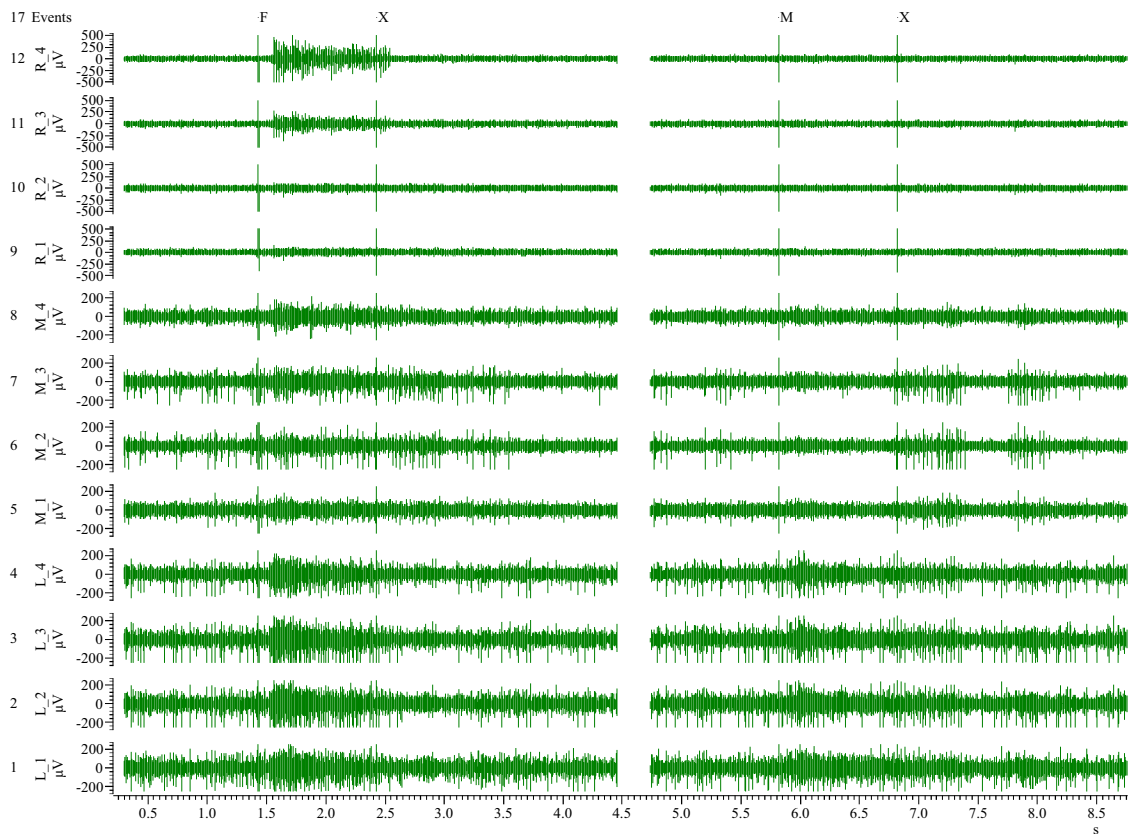


Abbildung 23: Die neuronale Ensemblerepräsentation der Düfte an derselben Ableitstelle ist duftspezifisch. Der Stimulusbeginn ist wieder durch die Buchstaben markiert. Gezeigt ist die aufeinander folgende Präsentation der Düfte 1-Hexanal und 1-Octanol. Auf den Kanälen sind spezifische Kombinationen von MUA-Antworten zu erkennen

Die folgenden Beispiele zeigen, dass die Duftrepräsentationen im Raum der ersten 3 Hauptkomponenten Cluster bilden und sich somit voneinander unterscheiden lassen. Die aufsteigende Reihenfolge der Duftapplikationen ist durch die zunehmende Größe der Punkte dargestellt. Jede Farbe markiert einen Duft. Die Qualität dieser Clusterbildung variierte von Tier zu Tier, da immer von verschiedenen Ensembles abgeleitet wurde und ebenso die Datenqualität durch das Signal-Rausch-Verhältnis stark schwankte. Die dargestellten Beispiele zeigen das Zeitfenster der ersten 500 ms während Duftapplikation. Eine Trennung der verschiedenen Ensembles in einem Zeitfenster vor Applikation, also während Spontanaktivität, war nicht zu beobachten. Das Baumstrukturdiagramm verdeutlicht die Gruppierung. Die Abstände zwischen allen Vektorpunkten wurden berechnet und hierarchisch angeordnet.

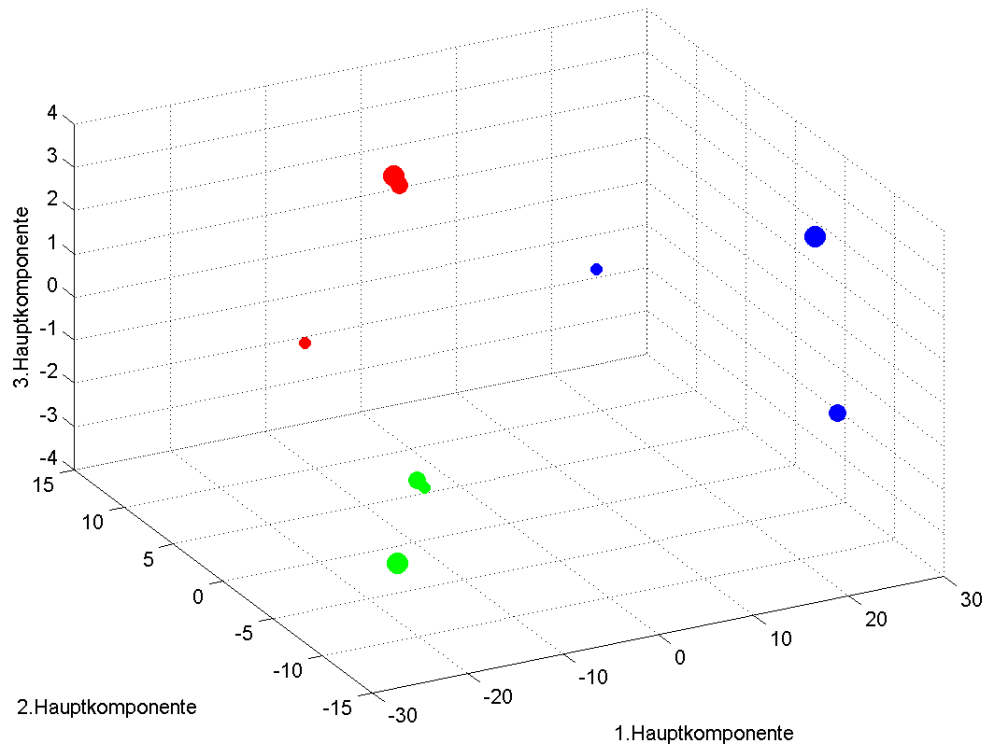


Abbildung 24: Darstellung der Ensembleantwort (4 MUAs) in einem Tier auf die Düfte 2-Hexanon (rot), Methylsalicylat (grün) und Cineol (blau) im Raum der ersten 3 Hauptkomponenten. Zeitfenster: 0-500ms nach Beginn der Stimulation. Für jeden Duft sind 3 Applikationen gegeben worden (ansteigende Größe der Punkte).

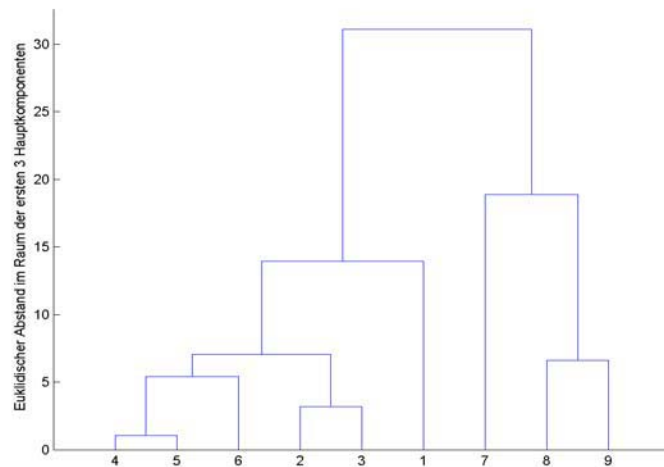


Abbildung 24 a) : Zugehöriges Baumstrukturdiagramm. 1,2,3: Duftapplikationen 2-Hexanon. 4,5,6: Duftapplikationen Methylsalicylat. 7,8,9: Duftapplikationen Cineol.

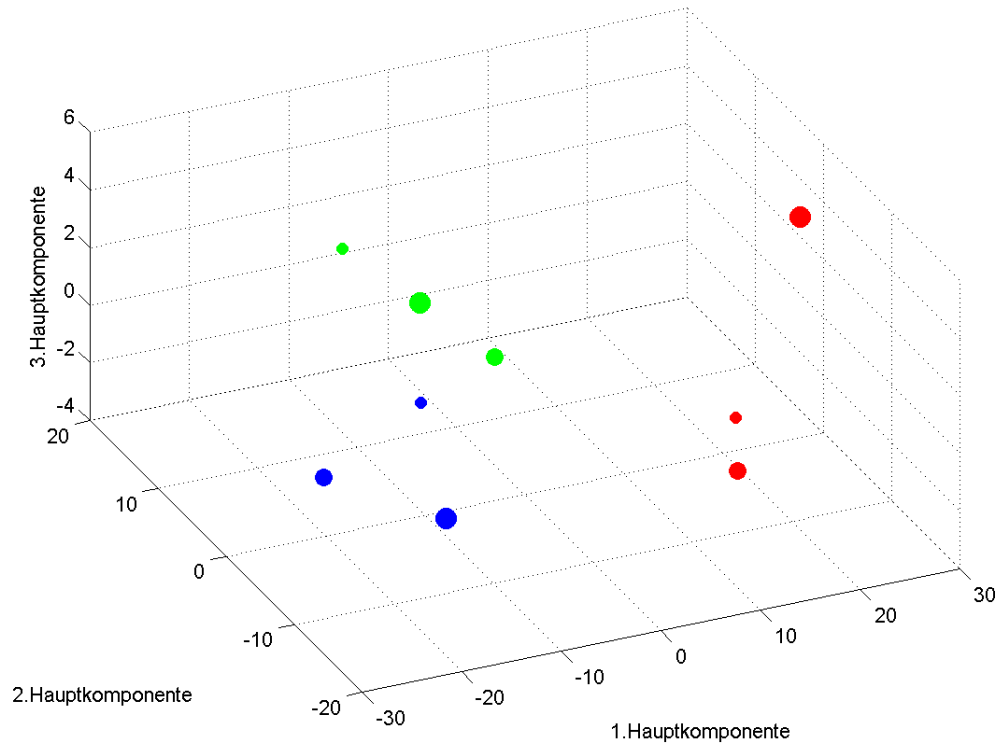


Abbildung 25: Darstellung der Ensembleantwort (5 MUAs) in einem Tier auf die Düfte 1-Hexanal (rot), 1-Heptanol (grün) und Pfefferminze (blau) im Raum der ersten 3 Hauptkomponenten. Zeitfenster: 0-500ms nach Beginn der Stimulation.

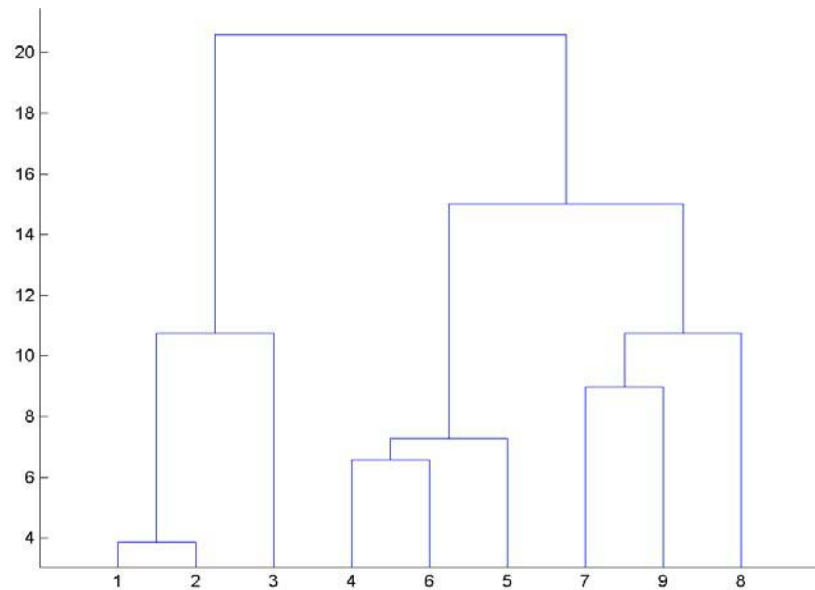


Abbildung 26: Zugehöriges Baumstrukturdiagramm. 1,2,3: Duftapplikationen 1-Hexanal. 4,5,6: Duftapplikationen 1-Heptanol. 7,8,9: Duftapplikationen Pfefferminze.

Da die letzten Abbildungen nur „Momentaufnahmen“ der Duftrepräsentationen in einem Tier sind, ist es noch interessant zu fragen, bei welchem Zeitpunkt der Duftgabe die Repräsentation im AL am eindeutigsten ist, d.h., wann die Cluster im Raum der ersten 3 Hauptkomponenten am weitesten voneinander entfernt sind.

Zu diesem Zweck wurden die euklidischen Abstände der Cluster für Zeitfenster von jeweils 300 ms über einen Zeitraum von 300 ms vor Duftgabe bis 500 ms nach Ende der Stimulation aufgetragen. Die 3 Punkte der Repräsentation für einen Duft wurden dabei gemittelt und die Abstände zwischen diesen Mittelwerten berechnet.

Das Ergebnis ist für zwei Beispiele in Abb.27 und Abb.28 dargestellt. In 40% aller Tiere ist der maximale Abstand zwischen den Duftrepräsentationen im Zeitfenster 0-300 ms nach Beginn der Stimulation erreicht, für 60% im darauf folgenden Zeitfenster 300-600 ms nach Beginn der Stimulation. Dies reflektiert natürlich die Dynamik der Duftantwort selbst. Wie aus Abb.17 hervorgeht, trat die stärkste Aktivität während der Duftgabe in den ersten 500 ms auf.

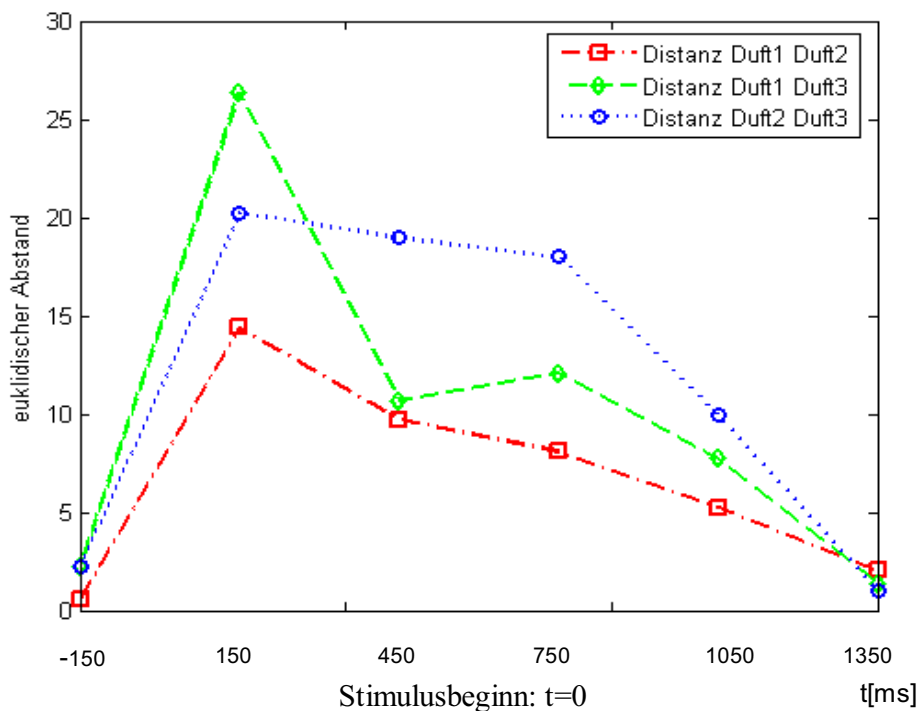
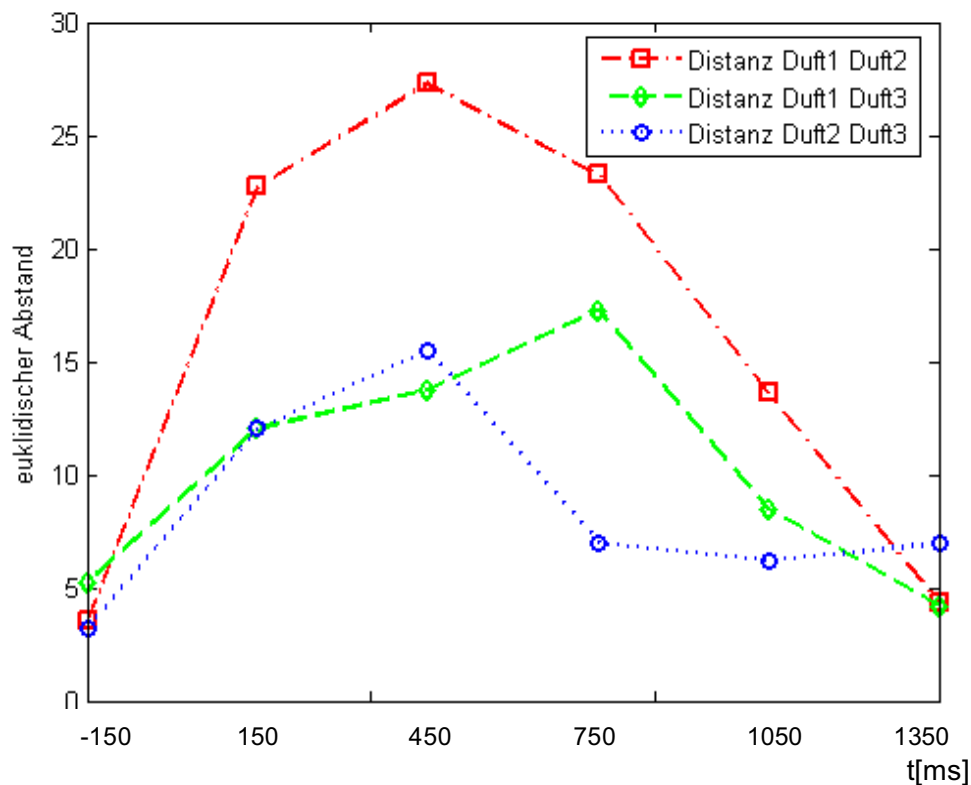


Abbildung 27: Euklidische Abstände der duftspezifischen Cluster der Duftrepräsentationen über die Zeit in einem Tier während der Prekonditionierungsphase. In einem Zeitraum von 300 ms vor bis 500 ms nach Stimulusende wurde für exklusive Zeitfenster von 300 ms Länge jeweils eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und der euklidische Abstand zwischen den Clustern berechnet. An diesem Beispiel kann man erkennen, dass der maximale Abstand im Zeitfenster 0-300 ms nach Stimulusbeginn erreicht wird, dann aber unterschiedlich schnell zum Abstand während der Spontanaktivität zurückgeht



Stimulusbeginn: t=0

Abbildung 28: Weiteres Beispiel eines Tieres. In diesem Fall wird das Maximum des Abstandes der Repräsentationen von Duft 1/Duft 2 und Duft 2/Duft 3 im Zeitfenster 300-600 ms nach Stimulusbeginn erreicht, während der Abstand zwischen den Repräsentationen von Duft 1/Duft 3 maximal im Zeitfenster 600-900 ms nach Stimulusbeginn wird.

3.2.4 Variabilität der Duftantworten in der Prekonditionierungsphase

Die Variabilität der *Ensemblerepräsentation* eines Duftes innerhalb der 3 Applikationen sowohl in der Prekonditionierungsphase als auch im Test nach der Konditionierung war in einigen Fällen stark ausgeprägt, wies im allgemeinen jedoch keine deutliche Reihenfolgenspezifität auf. In solchen Fällen ist es natürlich schwer, Vergleiche zwischen den Experimentphasen anzustellen, indem z.B. die Rate einzelner MUA's über alle 3 Trials der Prekonditionierungsphase gemittelt wird. Dieser Sachverhalt ist bei der gesamten Auswertung der Experimente im Hinblick auf Lernen zu bedenken und erschwert Vergleiche erheblich.

Um eventuelle Reihenfolgeeffekte in der Antwortstärke zu ermitteln, wurden für jedes Tier pro Duft die Abstände der 1.-3. Repräsentation im Raum der ersten 3 Hauptkomponenten berechnet. Es konnte keine signifikante Zu- oder Abnahme der

Abstände beobachtet werden, weder reihenfolgen- noch duftspezifisch. Ebenso wurden die Abstände der MUA-Repräsentationen für die unterschiedlichen Düfte untereinander jeweils für die 1., 2. und 3. Applikation berechnet. Auch hier variierten die Abstände reihenfolgenunspezifisch.

Auch eine Betrachtung des Antwortverhaltens *einzelner* MUAs belegt eine Variabilität bei wiederholter Duftgabe. Von den untersuchten 110 MUAs wurden 6 Beispiele gefunden, die innerhalb der Prekonditionierungsphase einer differentiellen Konditionierung zunehmend stärker antworteten, und ebenso 6 weitere, die zunehmend schwächer antworteten. Ein signifikanter duftspezifischer Unterschied zwischen den einzelnen Applikationen konnte auch bei der Untersuchung einzelner MUAs nicht gefunden werden.

Eine Kontrolluntersuchung des MUA-Antwortverhaltens in einigen Experimenten, in denen *jeweils nur ein Duft* mit demselben Abstand zwischen den Stimulationen wie in der differentiellen Konditionierung (1 min) präsentiert wurde, zeigt, dass eine graduelle Abschwächung der Antwortstärke von der 1. zur 10. Applikation erfolgt. Es wurde hier keine so starke Variabilität beobachtet wie in der Prekonditionierungsphase der differentiellen Konditionierung, allerdings liegt die Anzahl der untersuchten MUAs nur bei 10. Die Experimente sind schwer miteinander zu vergleichen, da im Fall der differentiellen Konditionierung 3 Düfte statt nur einem vorhanden sind und dies somit für das Tier eine andere Situation darstellt.

Typische Beispiele für Variabilitäten in den Antworten einzelner MUAs sind im Folgenden dargestellt.

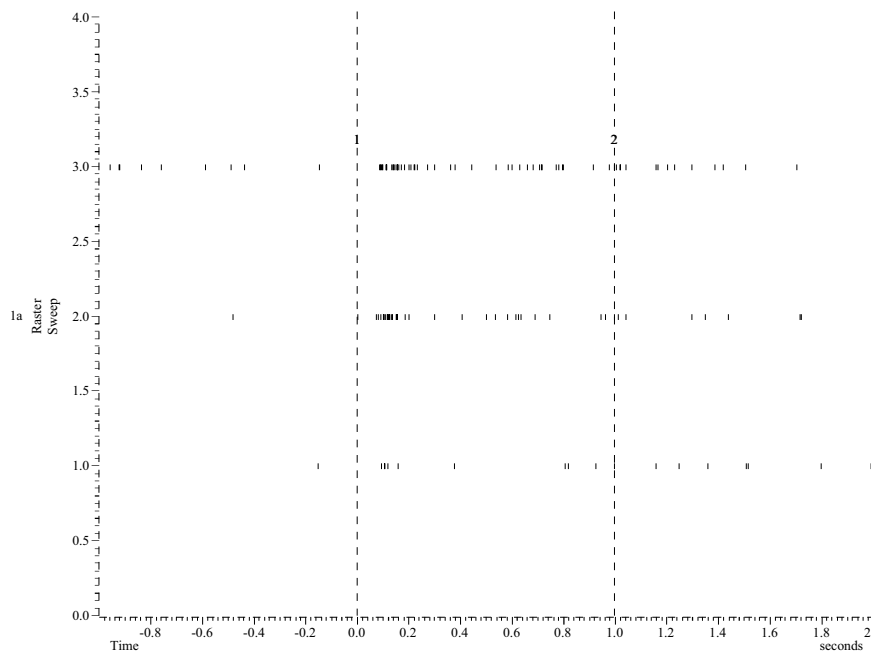


Abbildung 29: Zunahme der Antwortstärke einer MUA während der Prekonditionierung. Die beiden Linien markieren Beginn (1) und Ende (2) des Stimulus (hier Methylsalicylat)

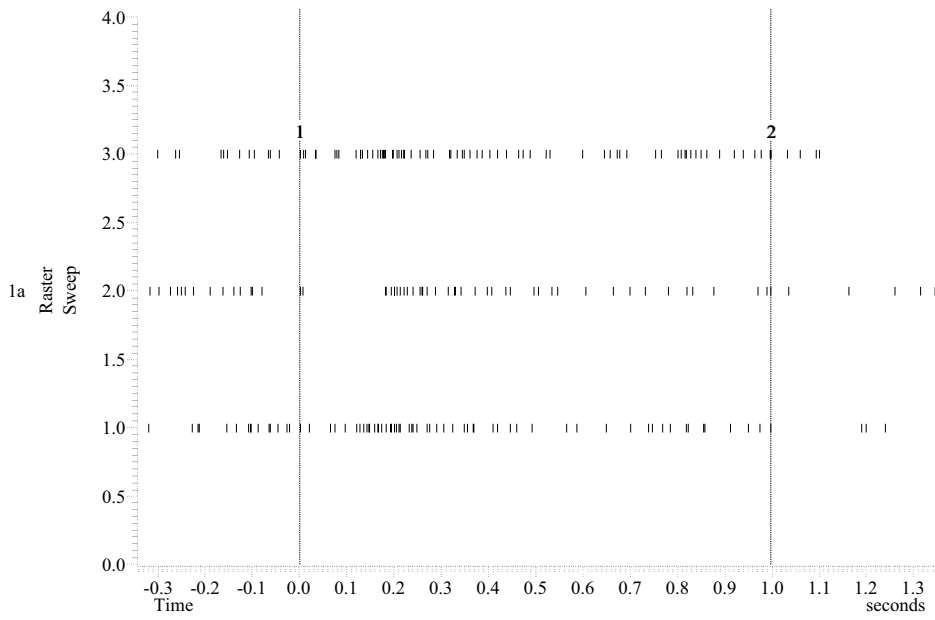


Abbildung 30: Typisches Beispiel für die Variabilität einer MUA-Antwort (hier Cineol).

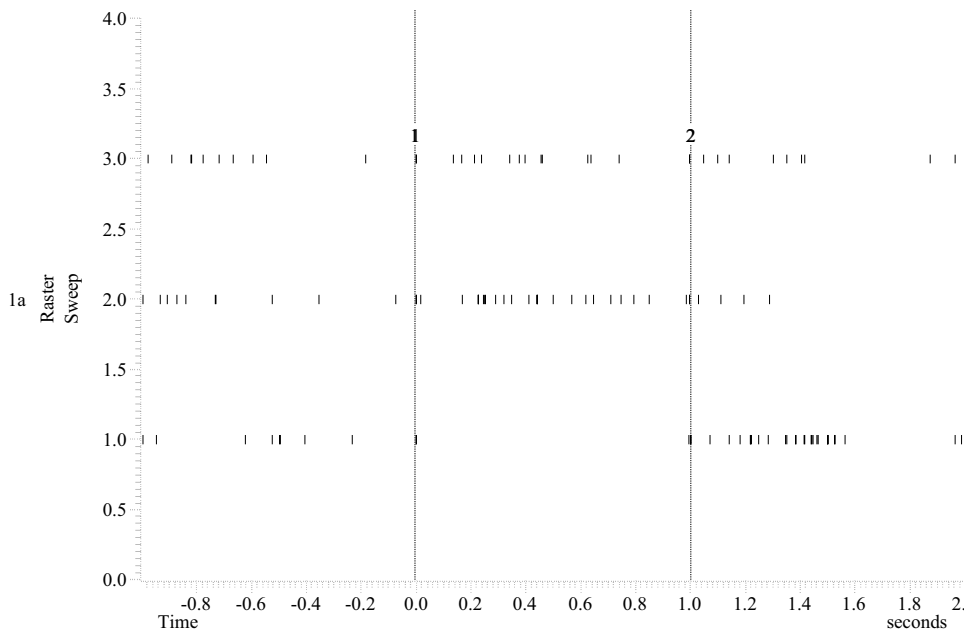


Abbildung 31: In diesem Beispiel scheint eine Inhibition während der 1. Applikation durch eine exzitatorische Antwort ersetzt zu werden (hier 2-Heptanon)