



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Kodierung langsamer Konzentrationsänderungen durch die olfaktorischen
Rezeptorneurone der Schabe (*Periplaneta americana*)

verfasst von / submitted by

Linhart Marlene, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the
degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2022 / Vienna, 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 878

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Master Verhaltens-, Neuro- und
Kognitionsbiologie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Hummel Thomas

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Danksagung

Bei Dr. Thomas Hummel möchte ich mich für seine Unterstützung bedanken und für seine anregenden Fragen bei den Vorträgen.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Maria Hellwig für die gute Einschulung und die vielen interessanten Stunden im Labor.

Ein lieber Dank geht an meinen Kollegen Alexander Martzok für die Hilfe bei der praktischen Arbeit im Labor und mit den Tieren. Und natürlich für die vielen Stunden im Labor beim Tüfteln.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Material und Methode.....	9
2.1 Präparation	9
2.2 Struktur der Sensillen.....	9
2.3 Durchfluss Olfaktometer	10
2.4 Messung	11
2.5 Auswertung	11
2.6 Statistik.....	11
3. Ergebnisse	13
3.1 Reaktionen der ORNs auf oszillierende Änderungen der Duftkonzentration	13
3.2 Reaktionen der ORNs auf kontinuierliche Änderungen der Duftkonzentration.....	19
4. Diskussion	25
4.1 Oszillierende Änderungsrate.....	25
4.2 Kontinuierliche Änderungsrate	26
5. Literatur	31

Alle Daten und Abbildungen wurden in folgendem Manuskript veröffentlicht:

Tichy, H., Linhart, M.; Martzok A. und Hellwig, M, (2020) The performance of olfactory receptor neurons: The rate of concentration change indicates functional specializations in the cockroach peripheral olfactory system. *Front. Physiol.* 11:599086 doi.org/10.3389/fphys.2020.599086

ABSTRACT

The cockroach (*Periplaneta americana*) uses its olfactory system to find food and mating partners. The animals have to recognize an odor that is interesting for them in their environment and be able to follow it to its source. An odor cloud extends from the source over a long distance and is not always a homogeneous plume. Wind and obstacles cause turbulences in the odor plume. The cockroach uses various parameters, such as the identity and concentration to achieve its goal.

For this purpose, the cockroach's antenna is covered with a large number of sensilla, which form the peripheral olfactory system.

Their large number and dense distribution help the animal to navigate along an odor plume to its source.

Five different sensilla types of the olfactory system are classified, which differ in their size and number of olfactory receptor neurons (ORNs).

In this work the basiconic type of sensilla is examined for its contribution to the olfactory system. What effect do parameters such as the current concentration and the speed of the change in concentration have on the activity of the olfactory receptor neurons?

For this purpose, the ORNs of basiconic sensilla are tested for their reaction to oscillating odor stimuli of varying duration. Results are compared with the previous work on ORNs in trichoid sensilla types, which are known to react to the rate of change for slow oscillating periods and to the instantaneous concentration for fast periods.

The ORNs of the basiconic sensilla differ in their reaction from the ORNs of the trichoid sensilla, they do not react to the rate of change and the instantaneous concentration at different period lengths.

In order to determine the sensitivity of the ORNs to the change in the odor concentration, continuous ramp-like rates of change are tested at different speeds. Here, the basiconic sensilla types show an individual reaction in terms of their pulse frequency. In comparison to the swC sensilla, whose sensitivity becomes higher at slow concentration increase than at fast ramps, the basiconic sensilla show no changed sensitivity depending on the speed. The results suggest that the different types of sensilla have different tasks in orienting themselves in an odor plume. The basiconic sensilla help to identify the olfactory stimulus, while the trichoid sensilla pass on information about the spatial and temporal distribution of concentration.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Schabe (*Periplaneta americana*) benutzt ihr Geruchssystem, um Nahrung und Geschlechtspartner zu finden. Die Tiere müssen in ihrer Umgebung einen für sie interessanten Duft ausmachen und in der Lage sein diesem bis zum Ursprung zu folgen. Eine Duftwolke erstreckt sich über eine lange Distanz und ist durch den Einfluss von Wind, nicht immer eine homogene Fahne. Die Schabe nutzt die verschiedenen Parameter, wie die Identität und die Konzentration, um ihr Ziel zu erreichen.

Hierfür ist die Antenne der Schabe überzogen mit einer großen Anzahl an Sensillen, die das periphere olfaktorische System der Schabe bilden.

Ihre große Anzahl und dichte Verteilung helfen dem Tier durch eine Duftwolke auf ihr Ziel hin zu navigieren.

Es werden fünf verschiedenen Sensillentypen des Geruchssystems klassifiziert, die sich in ihrer Form und Anzahl von olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORNs) unterscheiden.

In dieser Arbeit wird der basikonische Sensillentyp auf seinen Beitrag zum Geruchssystem untersucht. Welche Wirkung haben Parameter wie die momentane Konzentration und die Geschwindigkeit der Änderungsrate auf die Aktivität der olfaktorischen Rezeptorneuronen?

Hierfür werden die ORNs der basikonischen Sensillen auf ihre Reaktion bei oszillierenden Duftreizen unterschiedlicher zeitlicher Dauer getestet und mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten an den trichoiden Sensillentypen verglichen. Von denen bekannt ist, dass sie bei langsamen oszillierenden Perioden auf die Änderungsrate und bei schnellen Perioden auf die momentane Konzentration reagieren.

Die ORNs der basikonischen Sensillen unterscheiden sich in ihrer Reaktion von den ORNs der trichoiden Sensillen, sie reagieren nicht auf die Änderungsrate und die momentane Konzentration bei verschiedener Periodenlänge.

Um die Sensibilität der ORNs auf die Änderung in der Duftkonzentration zu bestimmen, werden ebenfalls kontinuierlichen rampenähnlichen Änderungsraten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit getestet. Auch hier zeigen die basikonischen Sensillentypen eine individuelle Reaktion in ihrer Impulsfrequenz, aber im Vergleich zu den trichoiden Sensillen, deren Sensibilität bei langsamem Anstieg höher wird als bei schnellen Rampen, zeigen die basikonischen Sensillen keine veränderte Sensibilität abhängig von der Geschwindigkeit.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die verschiedenen Sensillentypen verschiedene Aufgabe bei der Orientierung in einer Duftwolke haben. Die basikonischen Sensillen tragen zur Identifizierung des Duftreizes bei, während die trichoiden Sensillen Informationen über die räumliche und zeitliche Konzentrationsverteilung weitergeben.

1. Einleitung

Viele Tiere benutzen ihr Geruchssystem um für sie interessante Ressourcen wie Nahrung zu finden. Eine Duftwolke geht von der Quelle aus und verbreitet sich in der Umgebung. Dabei kommt es zu einer kleinräumigen Verbreitung und einer weiträumigen Verbreitung durch den Wind. Die Duftwolke verändert sich in ihrer Beschaffenheit abhängig von der Distanz zur Quelle. Je weiter weg von der Quelle desto niedriger ist die momentane Konzentration. Nahe an der Quelle steigt die momentane Konzentration schnell. (Murlis *et al.*, 1992, Moore and Atema, 1988) Betritt ein Insekt eine Duftwolke wirken verschiedene Parameter, wie Windrichtung, Identität des Duftes, Konzentration, Änderung in der Konzentration, auf das Tier ein. Welche Parameter kann das Tier nutzen, um erfolgreich an das Ziel zu gelangen.

Die amerikanische Schabe (*Periplaneta americana*) nutzt, um die Quelle der Duftwolke zu finden, ihre 4 cm lange Antenne. (Schaller, 1978) Aus Verhaltensversuchen zur Orientierung der amerikanischen Schabe in einer Duftwolke ist bekannt, dass die Tiere, wenn der Wind einen attraktiven Duft enthält, die Windrichtung nutzen können, um die Richtung zur Duftquelle auszumachen. Die Schaben erreichen ihr Ziel, aber auch wenn der Wind stoppt (Willis *et al.*, 2008, Willis und Avondet, 2015). Die Tiere sind in der Lage die Ränder zwischen der Duftwolke und reiner Luft als Orientierungshilfe in oder zur Duftfahne zu nutzen. Eine weitere mögliche Strategie für die Schabe, um der Duftwolke zu folgen ist die eingehende Information der beiden Antennen zu vergleichen. (Willis *et al.*, 2008) Aber auch Schaben mit einer verkürzten Antenne oder nur einer Antenne, ist es möglich erfolgreich die Quelle des Duftes zu erreichen, nur bewegen sie sich öfter zu beiden Seiten und stoppen öfter, um den Verlust ihres rezeptiven Feldes so abzudecken. Wichtig für den Erfolg ist, die Menge an verfügbaren Riechepithel. (Lockey und Willis, 2015)

Das Riechepithel befindet sich auf den Antennen, diese bestehen aus durchschnittlich 170 Segmenten, auf deren Oberfläche verschiedenste Arten von Sensillen sitzen, die wiederum die olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) beinhalten. (Schaller, 1978, Sass, 1973) Die verschiedenen Sensillentypen der Schabe wurden mit vielen verschiedenen Duftstoffen, mittels Pulse, aus einem einzelnen chemischen Stoff oder Mixturen aus mehreren Stoffen auf ihre Reaktion elektrophysiologisch untersucht. Unter anderem auch, das in dieser Arbeit verwendete Zitronenöl. Der Duft des Zitronenöls spricht viele verschiedenen Arten von Sensillen an und führt zu einer hohen neuronalen Antwort, in den für den Versuch interessanten Sensillentypen (Sass, 1973).

Die Sensillentypen unterscheiden sich anhand der Form, der Wandstruktur und der Anzahl der ORNs in ihrem Inneren. Schaller 1973, unterscheidet neben den beiden Typen Hygro- und Mechanorezeptoren, drei *single-walled* Typen (swA, swB und swC) und zwei Typen *double-walled* (dwA und dwB). Watanabe *et al.* (2012) klassifiziert die Typen von Sensillen in perforierte basikonische Sensillen (swA und swB), trichoide Sensillen (swC) und gerillte basikonische Sensillen (dwA und dwB).

Die drei ORNs der gerillt basikonische Sensillen dwA, reagieren auf verschiedene chemische Stoffe, wie Aldehyde, Carbonsäuren, Terpene und aromatische Verbindungen. Die Eigenschaften der gerillt basikonischen Sensillen dwB, sind bis jetzt nicht bekannt. Die perforierten basikonischen Sensillen swA, enthält zwei ORNs, diese reagieren auf Alkohole, Terpene, Ester und aromatische Verbindungen. Die perforierten basikonischen Sensillen swB, beinhalten vier ORNs, von denen zwei auf das Sexualpheromon und die anderen beiden auf Terpene reagieren. Die trichoiden Sensillen swC reagieren auf ein breites Spektrum von chemischen Verbindungen (Fusca und Kloppenburg, 2021; Schaller, 1978; Watanabe *et al.*, 2012).

Die Sensillentypen unterscheiden sich aber auch durch die Weiterleitung in das Zentralnervensystem. Die Axone der ORNs der swA und swB Sensillen ziehen in den antero - dorsalen Teil des Antennallobus, während die Axone der swC Sensillen in den postero - ventralen Teil laufen. Projektionsneurone des Typ 1 leiten das Signal der swC Sensillen in einen Teil des Pilzkörpers und Projektionsneurone des Typ 2 geben das Signal aus den swA und swB Sensillen weiter an einen anderen Teil des Pilzkörpers. Es gibt also zwei parallele olfaktorische Wege von der Peripherie zu den höheren Hirnregionen. (Watanabe *et al.*, 2017)

Frühere Arbeiten beschäftigten sich ausführlich mit dem swC Sensillen. Dabei wurden elektrophysiologische Ableitungen an den zwei ORNs der swC Sensille vorgenommen. Mittels eines Durchfluss-Olfaktometers wurden, im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten, keine Pulse, sondern langsame Duftreize mit oszillierender Änderungsrate verwendet. Oszillierende Änderungen imitieren die Konzentrationsschwankungen in einer Duftwolke. Bei variierender zeitlicher Dauer der Änderung kommt es zu selben Änderungsrate bei verschiedener momentaner Konzentration. Das gibt Aufschluss auf welchen Parameter des Duftreizes das Neuron reagiert (Hinterwirth *et al.*, 2004, Tichy *et al.*, 2005). Reizt man die beiden Sinneszellen der swC Sensille mit einer langsam an- und absteigende Duftkonzentration antworten diese antagonistisch. Auf einen ansteigenden Reiz reagiert das ON ORN mit einer ansteigenden Impulsfrequenz und die zweite, das OFF ORN, mit einer abfallenden Impulsfrequenz. So erhält die Schabe Information über den zeitlichen Verlauf der Duftkonzentration. Anstieg und Abfall der Konzentration werden mit Anstieg der Impulsfrequenz der beiden ORNs angezeigt, womit sich der Kontrast der Änderung erhöht. Beide zeigen eine hohe Sensibilität für die momentane Konzentration und die Änderungsrate der Konzentration eines Duftreizes (Hinterwirth *et al.*, 2004; Tichy *et al.*, 2005; Burgstaller and Tichy, 2012; Hellwig and Tichy, 2016). Das verschiebt sich bei Änderung der Zeitdauer einer Periode, denn bei schnellen kurzen Perioden sinkt die Sensibilität für die Änderungsrate und die Empfindlichkeit für die momentane Konzentration steigt. Wiederrum steigt bei langsamen Perioden die Sensibilität für die Änderungsrate und die Empfindlichkeit für die Konzentration sinkt (Tichy, *et al.*, 2016).

Um den Effekt der Konzentrationsänderung auf die ORNs zu untersuchen, wurden konstante Änderungsraten, also einem stetigen Ansteigen und Abfallen der Konzentration des Duftreizes, getestet. Hiermit ist es möglich aus der Impulsfrequenz das Auflösungsvermögen des ORNs zu errechnen. Das Auflösungsvermögen sagt aus, wie

sensibel ein ORN auf den Unterschied zweier Reize reagiert. ORNs der swC Sensille zeigen bei langsam ansteigender Rampe ein höheres Auflösungsvermögen als bei schnellem Anstieg, hierbei können die ORNs die Reizänderung weniger genau aufzeigen (Tichy, *et al.*, 2016).

In der hier beschriebenen Arbeit wurden elektrophysiologische Ableitungen an den beiden *single-walled* Typen (swA und swB) gemacht um ihre Reaktion, auf langsam fluktuierende und rampen -förmige Änderungen der Duftkonzentration, zu untersuchen. Eine elektrophysiologische Ableitung ist möglich da die Basis einer einzelnen Sensille mit der Elektrode gut erreichbar ist und die Sensillen nur wenige Sinneszellen beinhalten (Sass, 1973).

Es werden dieselben Versuche, wie bei den vorangegangenen Versuchen der swC Sensille durchgeführt, um die Ergebnisse zu vergleichen.

Hier sollen die Fragen geklärt werden, welche Rolle die beiden basikonischen Sensillentypen bei der Orientierung in einer Duftfahne haben. Auf welchen Parameter eines Duftreizes reagieren die ORNs dieser Sensillen. Können die momentane Konzentration und die Geschwindigkeit der Änderungsrate von den ORNs der basikonischen Sensillen kodiert werden? Und auf welche Weise ändert sich die Impulsfrequenz der ORNs bei langsamen Konzentrationsänderungen gegenüber schnellen Konzentrationsänderungen?

2. Material und Methode

2.1 Präparation

Für die Versuche werden männliche Schaben (*Periplaneta americana*) mittels CO₂ narkotisiert und in einem Plexiglashalter mit Parafilm fixiert. Eine Antenne, die für die Ableitung ausgewählt wurde, auf einem Steg mittels Dentalzement (Harvard Cement, Harvard Dental Gesellschaft Berlin) und Klebeband an den Steg des Präparathalters fixiert.

Die Ableitelektrode und die Referenzelektrode sind Wolframnadeln, die elektrochemisch geätzt und dabei gespitzt werden.

Die Referenzelektrode wird in die abgeschnittene Spitze der Antenne eingeführt, während die Ableitelektrode an der Basis der Sensille platziert wird.

2.2 Struktur der Sensillen

Die, von Schaller (1978) klassifizierten single – walled A (swA) und single -walled B (swB) Sensillen wurden für diese Versuche herangezogen.

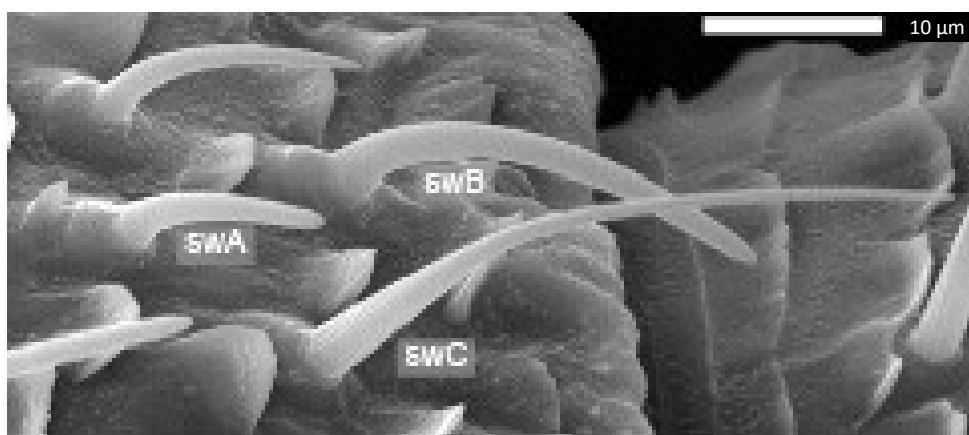


Abb. 1: Rasterelektronen Aufnahme der Antennenoberfläche an dem oberen Ende eines Antennensegments. Die Sensillen können anhand ihrer Form unterschieden werden (Tichy *et al.*, 2020).

Die swA Sensillen haben eine Länge von 8 – 12 μm und endet stumpf. In ihnen ziehen Dendriten zweier oft verzweigte Neurone bis in die Spitze. Dieser Typ ist über die gesamte Länge der Antenne, mit einer Häufigkeit von 8 %, verteilt. Die swB Sensille ist der häufigste Sensillentyp auf der Antenne der Schabe, mit 54 % der Gesamtanzahl der Sensillen. swB Sensillen sind 18 – 28 μm lang, ebenfalls stumpf und beinhalten vier verzweigte ORNs. (Schaller, 1978)

2.3 Durchfluss Olfaktometer

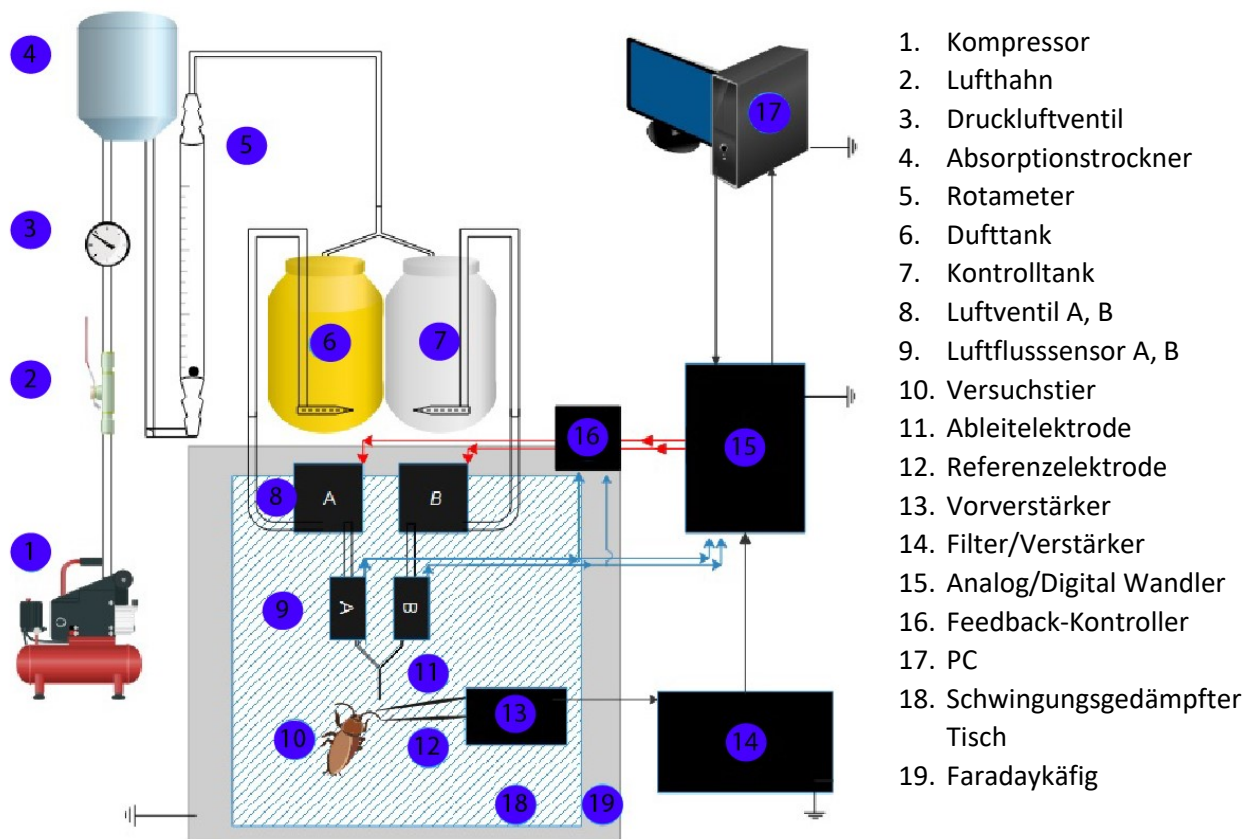


Abb.2: **Schematische Darstellung des Durchfluss – Olfaktometers.** Die schwarzen Pfeile zeigen den Weg des Signals von der Antenne zum PC. Der Istwert des Luftstroms wird gemessen von Luftflusssensoren (blaue Pfeile) und im Feedback-Kontroller mit dem Soll-Wert vom Analog/Digital Wandler (rote Pfeile) verglichen und korrigiert.

Für die Versuche wird ein Durchfluss – Olfaktometer verwendet, der schematische Aufbau ist in Abbildung 2 zu sehen.

Die verwendete Luft kommt vom Kompressor (1) durch Öffnen des Lufthahns (2) zum Luftventil (3), an dem der Druck eingestellt wird. Im Absorptionstrockner (4) wird der Luft die Feuchtigkeit entzogen. Am Rotameter (5) wird der Luftdruck auf einen konstanten Wert geregelt. Der gereinigte Luftstrom wird geteilt und einerseits durch den Tank (6) mit dem Duftstoff Zitronenöl (relative Dichte = 0,85, Art. 5213.1; Carl Roth GmbH + Co. 114 KG; Karlsruhe, Germany) sowie durch den leeren Tank (7) geblasen. Danach gelangen die Luftströme zu den beiden Ventilen (8), über die Duftkonzentration variiert wird. Durch Öffnen der Ventile wird die Luft durch einen Luftflusssensor (9) geleitet und treffen vereint auf die Antenne der Schabe (10). Der gesamte Luftstrom bleibt stetig konstant und wird vom Feedbackcontroller (16) überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die Ableit- (11) und Referenzelektrode (12) sind in der Antenne der Schabe eingestochen. Das Spannungssignal wird vom Vorverstärker (13) verstärkt und weitergeleitet an den Filter und Verstärker (14). Im Analog/Digital Wandler (15) wird das Signal umgewandelt und an

den PC (17) weitergeleitet. Um Erschütterungen und Fremdsignale zu verringern wird der Versuch in einem geerdeten Faradaykäfig auf einem Schwingungsgedämpften Tisch durchgeführt (Tichy *et al.* 2020).

Das Computerprogramm Spike2, (v.6; Cambridge Electronic Design [CED], Cambridge, UK) steuert die Ventile und das Mischungsverhältnis von Duftstrom und reinem Luftstrom im gesamten Luftstrom. 0 % bedeutet das nur Ventil B geöffnet ist und nur reine Luft auf die Antenne trifft. Bei einer Anzeige von 50 % sind beide Ventile zur Hälfte geöffnet und ein Gemisch aus 50 % Duftstoff und 50 % reine Luft strömt aus. 100 % bedeutet, dass nur Ventil A geöffnet ist und nur mit Duft angereicherte Luft auf die Antenne trifft. Nicht nur die Duftkonzentration kann geändert werden auch die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung. Für eine oszillierende Änderung der Konzentration werden die beiden Ventile mit einer Phasenverschiebung von 180° durch den Ausgabesequenzierer der Software (Spike2, v.6; Cambridge Electronic Design [CED], Cambridge, UK) angesteuert.

Für den Versuch werden oszillierende Änderungen mit verschiedener Zeitdauer (3s, 6s, 30s, 60s und 120s) durchgeführt. Bei oszillierenden Änderungen variiert die Änderungsrate der Konzentration.

Bei konstanter Änderungsrate entstehen rampenähnliche Anstiege der Konzentration. Diese werden in verschiedenen Geschwindigkeiten (50 %/s, 25 %/s, 10 %/s, 5 %/s und 2,5 %/s) getestet, dadurch kann getestet werden ob und wie stark das Auflösungsvermögen für Konzentrationszunahme von der Geschwindigkeit abhängt.

2.4 Messung

Für die extrazelluläre Ableitung wird die Ableitelektrode in der Basis der Sensille eingestochen, somit wird ein Spannungsunterschied zwischen der Referenz- und Ableitelektrode aufgezeichnet. Das Signal wird verstärkt und gefiltert (0.1–3 kHz) und nachdem es den Analog – Digital Wandler (CED, Cambridge Electronic 102 Design, 12 Bit, 167 kHz) durchlaufen hat, wird es am PC für die spätere Auswertung gespeichert.

2.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit dem Programm Spike2 (Spike2, v.6; Cambridge Electronic Design [CED], Cambridge, UK). Für die Auswertung muss ein Zeitintervall gewählt werden, in dem die Aktionspotentiale gezählt werden. Um die Reaktion der swA und swB Sensillen mit den bisherigen untersuchten swC Sensillen zu vergleichen, werden dieselben Zeitintervalle gewählt. 0,2 s zur Auswertung der Reaktionen auf oszillierende Konzentrationsänderungen (Burgstaller und Tichy, 2012) und 0,5 s für 5 %/s-Rampen, 0,2 s für 20 %/s-Rampen und 0,1 s für 50 %/s-Rampen (Tichy *et al.*, 2016).

2.6 Statistik

Für die weitere Auswertung und Erstellen von Diagrammen wird SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc. USA) verwendet.

Da bei rampenähnlichen Duftreizen die Änderungsrate konstant ist, kann damit das Auflösungsvermögen eines ORNs berechnet werden. Das Auflösungsvermögen definiert, wie sensibel das ORN auf ein Ansteigen und Abfallen eines Reizes reagiert. Also wie genau ist die Fähigkeit des ORN die Änderung in der Konzentration zu unterscheiden.

Für die Berechnung des Auflösungsvermögens wird die Formel von Loftus und Corbière-Tichané (1981) verwendet.

$$\Delta x = \frac{\sqrt{2}\sigma}{|b|} \Phi^{-1}(y)$$

In der ist $|b|$ die mittlere absolute Steigung der Reizantwortfunktionen, σ ist die Varianz der Abweichungen der einzelnen Punkte von der Regression. Y ist die erforderliche Wahrscheinlichkeit (90%) und $\Phi^{-1}(y)$ ist die Umkehrung der Verteilungsfunktion einer standardisierten, normal verteilten Zufallsvariable. $\Phi^{-1}(0,9) = 1,28$ (Dien und Lentner, 1970, Tabellen, S. 28)

σ wird für eine lineare Regression wie folgt berechnet,

$$\sigma^2 = \frac{\sum \varepsilon^2}{n - 2I} \quad \text{und für eine parabolische} \quad \sigma^2 = \frac{\sum \varepsilon^2}{n - 3I},$$

wobei ε die Abweichung jedes einzelnen Punktes von seiner Kurve ist, I die Anzahl der Kurven ist und

n die Anzahl der Messungen. n wird um die Anzahl der Freiheitsgrade reduziert, die $2I$ beträgt

weil 2 Schätzungen notwendig sind, um jede Gerade zu bestimmen (a und b ; $y = a + bx$). Wird

das Auflösungsvermögen aus Parabeln berechnet, wird n um $3I$ reduziert, entsprechend der 3 Schätzungen für jede Parabel (a , b und c ; $y = a + bx + cx^2$).

3. Ergebnisse

Insgesamt wurde der Versuch an 210 Sensillen durchgeführt. Die Reaktion von vierundvierzig swA und vierzig swB Sensillen werden genauer untersucht. In diese Arbeit fließen die Auswertung von 10 swA und 7 swB Sensillen ein, die eindeutig im Versuch und in ihrer Reizantwort ihrer Sensillentypen zu geordnet werden können.

3.1 Reaktionen der ORNs auf oszillierende Änderungen der Duftkonzentration

Eine erfolgreiche Ableitung dauert durchschnittlich 28 Minuten. Mit oszillierenden Änderungen der Duftkonzentration können Konzentrationsschwankungen in einer Duftwolke imitiert werden. Durch variierende zeitliche Dauer der Änderung kommt es zu selben Änderungsrate bei verschiedener momentaner Konzentration. Das gibt Aufschluss auf welchen Parameter des Duftreizes das ORN reagiert. Auf die Antenne wird ein konstanter Luftstrom ohne Duftstoff geblasen, beim Einsetzen des Duftreizes steigt die Konzentration oszillierend, in vorgegebener Zeit, von 0% auf 50% und fällt wieder auf 0% ab, jede der einzelnen sinusförmige Änderungsrate wird dreimal hintereinander getestet. Zur Auswertung werden die Oszillationsperioden 6 s, 60 s und 120 s gewählt (Abb. 3).

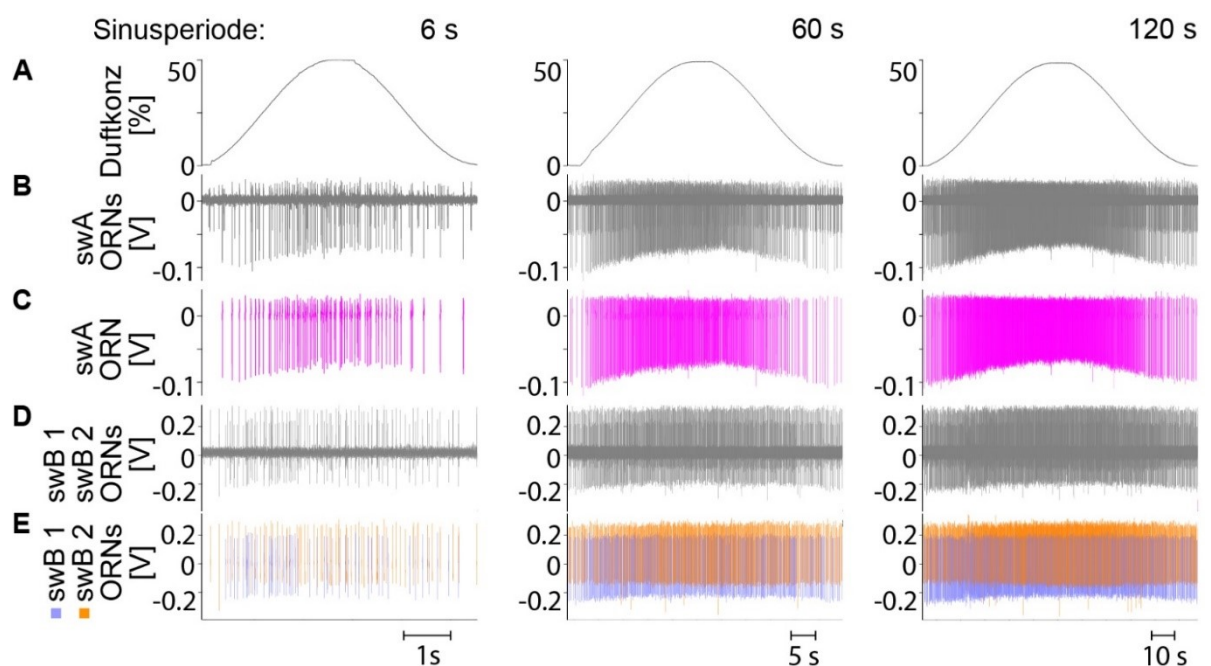


Abb. 3: **Originalregistrierung der Reaktion von ORNs in swA und swB Sensillen bei verschieden lang andauernden Oszillationen der Duftkonzentration** (A) Zeitlicher Verlauf der Duftkonzentration für die drei Perioden (6s, 60s, 120s). (B) Gemessenes Spannungssignal der ORNs im swA Sensillum. (C) Diskriminierte Spikes eines ORNs des swA Sensillum. (D) Gemessenes Spannungssignal der ORNs im swB Sensillum. (E) Diskriminierte Spikes zweier ORNs des swB Sensillum. Mit Ansteigen des Duftreizes erhöht sich die Impulsfrequenz der ORNs beider Sensillentypen. Bei Abfallen der Duftkonzentration sinkt die Impulsfrequenz (Tichy *et al.*, 2020).

Zwei ORNs ziehen durch das swA Sensillum, doch nur das eine ORN, mit der größeren Amplitude, reagiert mit Erhöhen der Impulsfrequenz auf den Anstieg des Duftreizes. Nur diese wird für die weitere Auswertung herangezogen und ist in Abb.3 C, in pink dargestellt.

In der swB Sensille zeigen zwei Neuronen eine Erhöhung ihrer Impulsfrequenz, einsetzend mit dem Anstieg der Duftkonzentration. Aufgrund der unterschiedlichen Amplitude der beiden Aktionspotentiale können sie gut unterschieden und ihre Reizantwort getrennt voneinander untersucht werden. Für das Neuron swB 1 wird die Farbe Blau und für das Neuron swB 2 die Farbe Orange gewählt.

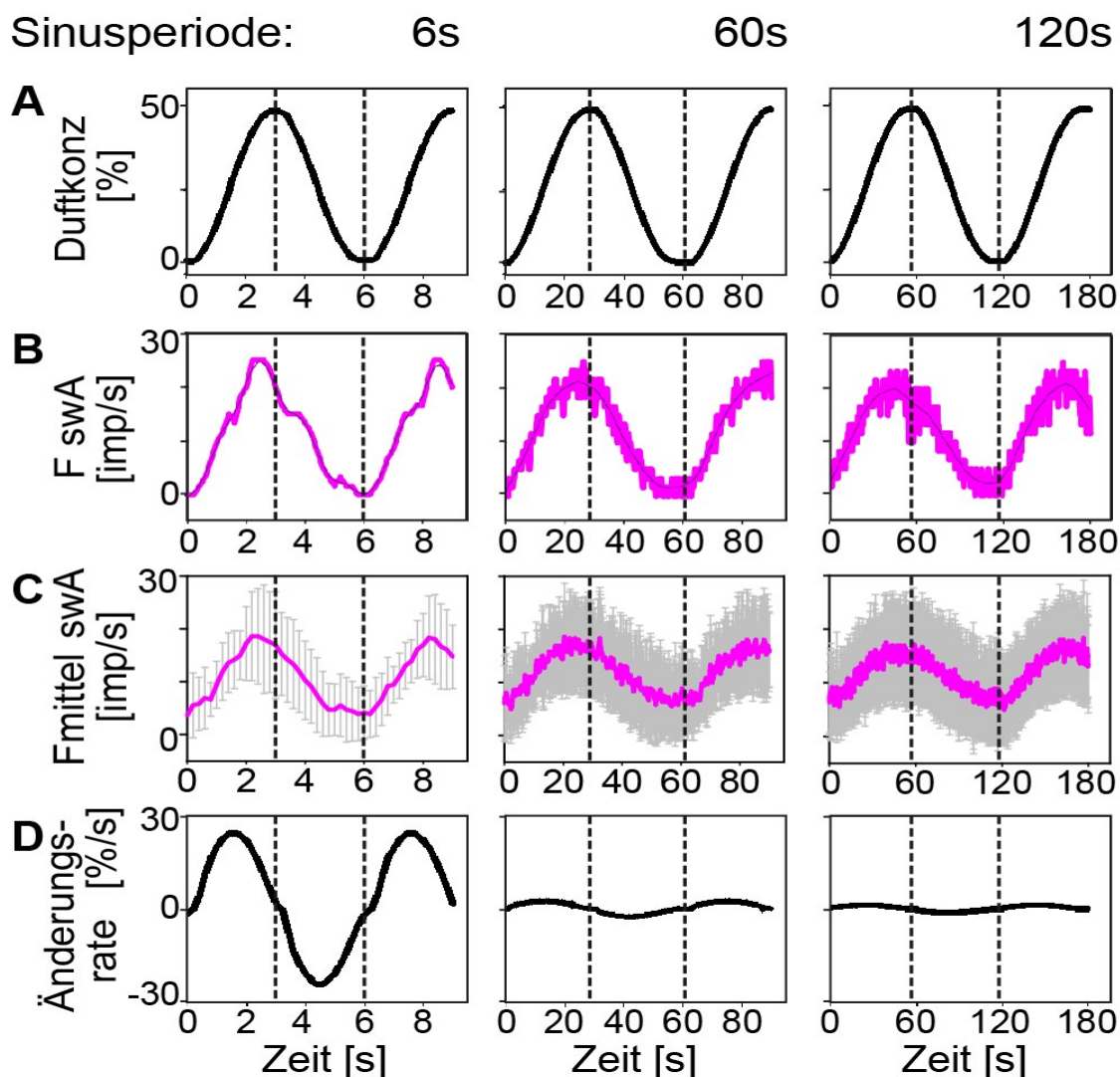


Abb.4: **Reaktion des swA ORN auf oszillierende Änderung** (A) Zeitlicher Verlauf der oszillierenden Duftkonzentration mit der Dauer von 6 s, 60 s und 120 s, (B) Zeitverlauf der Reaktion einer einzelnen Zelle, die dünnere dunkle Linie zeigt die geglättete Kurve der Reaktion. (C) Zeitverlauf vom Mittelwert und Standardabweichung von 10 ORNs. (D) Zeitdiagramm für die Änderungsrate. Die gepunktete Linie zeigt die Phasenverschiebung zwischen dem Maximum der Duftkonzentration, der Reaktion und der Änderungsrate im Zeitverlauf des Konzentrationsmaximum und -minimum, der Reaktion und Änderungsrate (Tichy *et al.*, 2020).

Abbildung 4 zeigt den Zeitverlauf der Duftkonzentration (Abb. 4A), und der Reaktion als Einzelbeispiel (Abb. 4B) sowie Mittelwert mit Standardabweichung von 10 ORNs (Abb. 4C), und die Änderungsrate der Duftkonzentration (Abb. 4D). Das Zeitintervall von eineinhalb Perioden wurde gewählt, um die gesamte Reaktion des Neurons auf den An- und Abstieg der Duftkonzentration besser zu veranschaulichen. Vergleicht man die beiden ersten Zeilen (Abb. 4 A, B) sieht man, dass die Reaktion des ORN die Änderung der Duftkonzentration widerspiegelt. Aber weder die Einzelzelle (Abb. 4B) noch die Darstellung des Mittelwerts von 10 swA Neuronen (Abb. 4C) hat den Höhepunkt ihrer Feuerrate beim Maximum des Duftreizes. Betrachtet man die letzte Zeile, die die Änderungsrate gegen die Zeit zeigt, mit der Reaktion der einzelnen Zelle (Abb. 4B) oder den Mittelwert mehrere Zellen (Abb. 4C), sieht man, dass sich das Maximum der Reaktion des ORN dem Maximum der Änderungsrate annähert. Die gepunkteten Linien in Abbildung 4 machen es deutlicher, dass es zu einer Phasenverschiebung, zwischen der Konzentration, der Impulsfrequenz und der Änderungsrate kommt. Alle drei Werte durchlaufen denselben sinusförmigen Verlauf doch mit unterschiedlichem Zeitpunkt des Maximums.

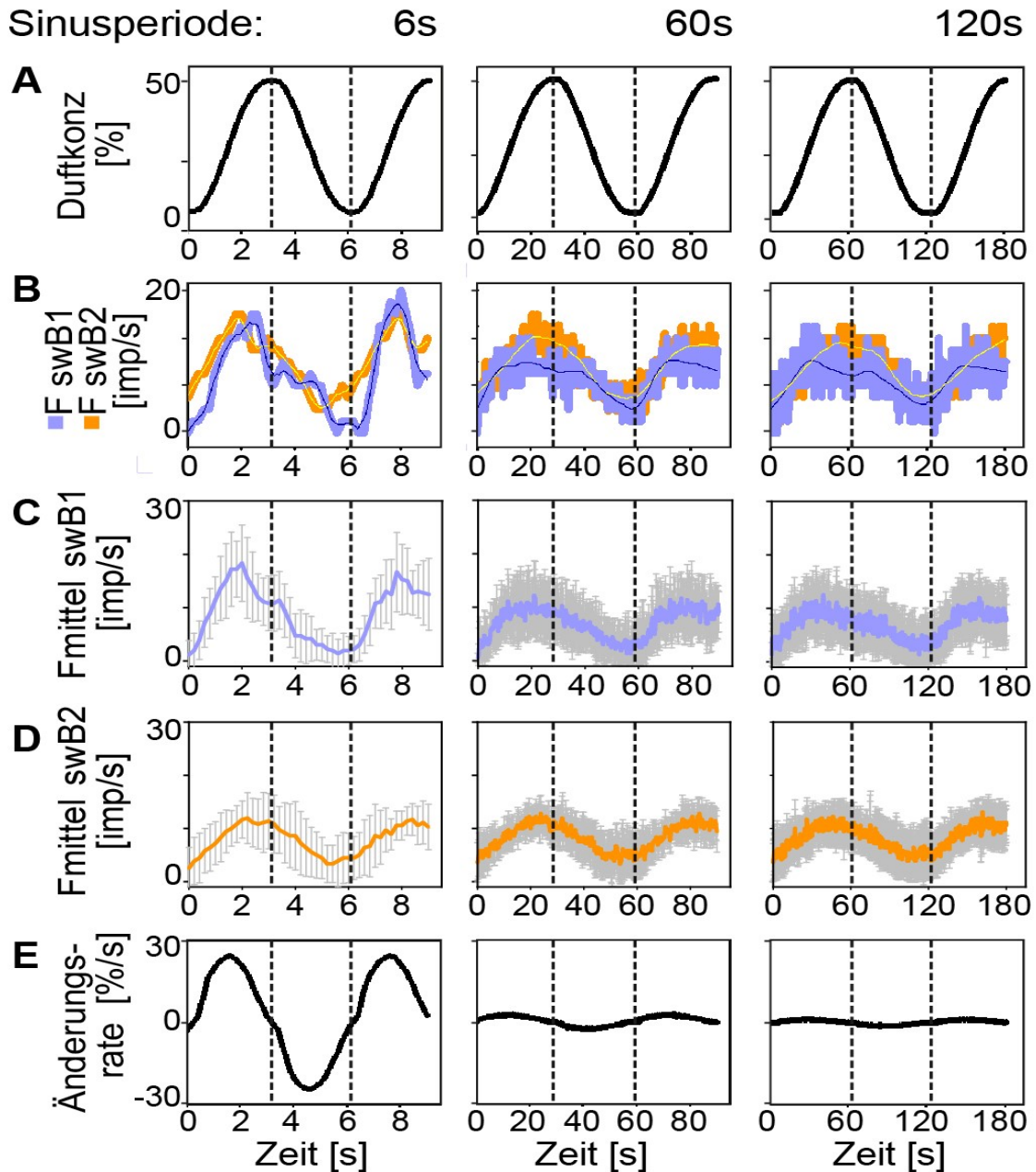


Abb.5: **Reaktion der swB1 und swB2 ORNs auf oszillierende Änderung** (A) Zeitlicher Verlauf der oszillierenden Duftkonzentration mit der Dauer von 6 s, 60 s und 120 s, (B) Zeitverlauf der Reaktion eines swB1 (blau) und swB2 (orange) ORNs, die dünnere dunkle Linie zeigt die geglättete Kurve der Reaktion. (C) Zeitverlauf vom Mittelwert und Standardabweichung von 6 swB1 ORNs. (D) Zeitverlauf vom Mittelwert und Standardabweichung von 7 swB2 ORNs (E) Zeitdiagramm für die Änderungsrate. Die gepunktete Linie zeigt die Phasenverschiebung zwischen dem Maximum der Duftkonzentration, der Reaktion und der Änderungsrate im Zeitverlauf des Konzentrationsmaximum und -minimum, der Reaktion und Änderungsrate (Tichy *et al.*, 2020).

In Abbildung 5A sieht man, den zeitlichen Verlauf des Duftreizes, darunter in 5B sieht man ein Beispiel für die Reaktion der beiden ORNs der swB Sensille. Die beiden ORNs reagieren unterschiedlich auf den Duftreiz. Beide erhöhen ihre Impulsfrequenz beim Einsetzen des Duftreizes. Die Impulsfrequenz des swB1 ORNs steigt steil an und ist beim Erreichen des

Konzentrationsmaximum wieder halbiert, danach sinkt sie langsam ab, besonders deutlich zu erkennen bei der kürzesten Sinusperiode (Abb. 5B).

Aber auch in der Abbildung der Mittelwerte (Abb. 5C) von 7 ORNs der swB1 Sensille sieht man, diese besondere Form der Reaktion.

Im Einzelbeispiel (Abb. 5B) und im Mittelwert (Abb. 5D) ähneln sich die Reaktionen des swB2 ORNs unabhängig von den drei Geschwindigkeit der Änderungsrate. Die Impulsfrequenz steigt stetig an, erreicht das Maximum und sinkt wieder ab. Auch die Streuung um den Mittelwert bleibt in allen drei Sinusperioden ähnlich.

In beiden Fällen liegt das Maximum der Impulsfrequenz zwischen dem Maximum der Duftkonzentration und dem Maximum der Änderungsrate (Abb. 5E). Es kommt zu einer Phasenverschiebung zwischen der momentanen Konzentration, der Impulsfrequenz und der Änderungsrate.

Um den Einfluss der beiden Parameter auf die Impulsfrequenz der ORNs genauer zu beschreiben, werden 3D Plots für die Oszillationsperioden 6 s, 60 s und 120 s gefertigt, in denen die doppelte Abhängigkeit graphisch sichtbar gemacht wird.

Schwingungsperiode: 6 s

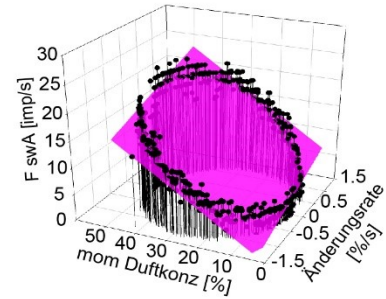
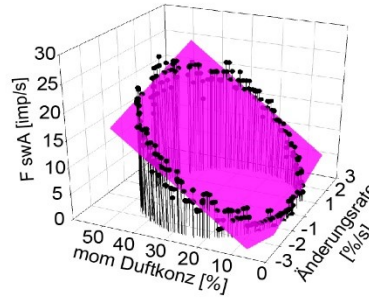
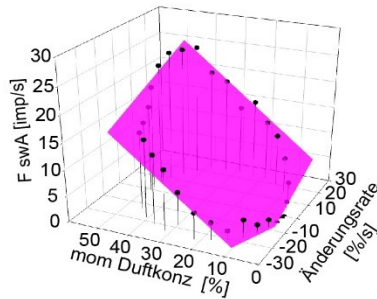
60 s

120 s

A $F = -0,51 + 0,17 (\%/s) + 0,45 (\%)$
 $R^2 = 0,95$ $n = 30$

$F = 0,46 + 0,17 (\%/s) + 0,42 (\%)$
 $R^2 = 0,95$ $n = 300$

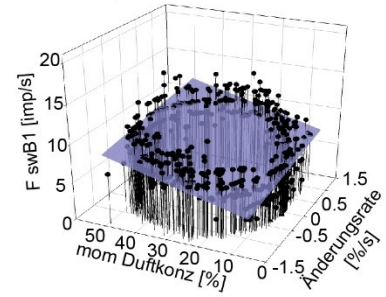
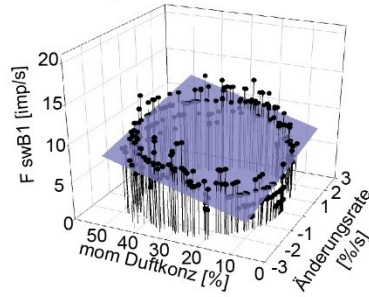
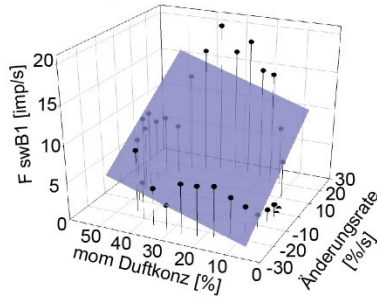
$F = 1,86 + 2,86 (\%/s) + 0,36 (\%)$
 $R^2 = 0,92$ $n = 600$



B $F = 4,33 + 0,21 (\%/s) + 0,13 (\%)$
 $R^2 = 0,60$ $n = 30$

$F = 4,54 + 0,50 (\%/s) + 0,11 (\%)$
 $R^2 = 0,53$ $n = 300$

$F = 4,99 + 0,71 (\%/s) + 0,10 (\%)$
 $R^2 = 0,45$ $n = 600$



C $F = 4,2 + 0,10 (\%/s) + 0,19 (\%)$
 $R^2 = 0,90$ $n = 30$

$F = 3,75 + 0,15 (\%/s) + 0,19 (\%)$
 $R^2 = 0,84$ $n = 300$

$F = 4,32 + 0,21 (\%/s) + 0,17 (\%)$
 $R^2 = 0,82$ $n = 600$

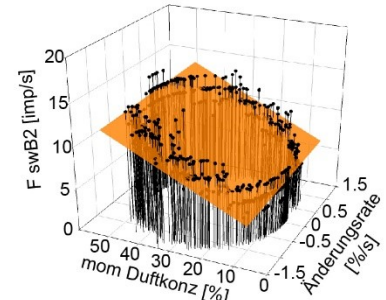
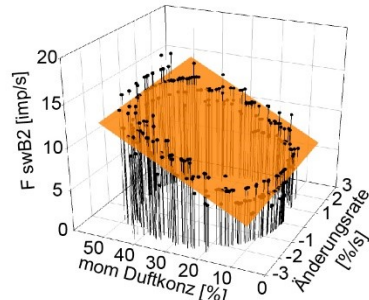
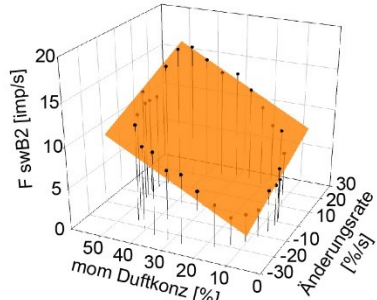


Abb.6: Reaktion der ORNs auf momentane Konzentration und Änderungsrate. Impulsfrequenzen einzelner (A) swA, (B) swB1 und (C) swB2 ORNs während drei verschiedenen Sinusperioden des Duftreizes aufgetragen als Funktion der momentanen Duftkonzentration und ihrer Änderungsrate. [$F = y_0 + ax + by$; wobei F die Impulsfrequenz und y_0 die Höhe der Regressionsebene ist; ax ist die Neigung zur Änderungsrate und by gibt die Neigung zur momentanen Duftkonzentration an] R^2 , Bestimmtheitsmaß; n , Anzahl der Punkte pro Plot (Tichy *et al.*, 2020)

Um die Beziehung zwischen der momentanen Konzentration und der Änderungsrate zu sehen, wird die Reaktion der swA und der beiden swB ORNs mit der Funktion [$F = y_0 + ax + by$, wobei F die Impulsfrequenz und y_0 die Höhe der Regressionsebene ist, ax die Neigung zur Änderungsrate und by die Neigung zur momentanen Duftkonzentration angibt] beschrieben, für die drei unterschiedlichen Perioden, gegeneinander aufgetragen wird. (Abb. 6) R^2 Wert gibt an wie gut die Regressionsebene die unabhängige Variable voraussagt. Der Neigungswert gibt Aufschluss über die Empfindlichkeit des ORNs für die Änderungsrate und die momentane Duftkonzentration. Bei der swA ORN (Abb. 6A) ist die Empfindlichkeit für die momentane Konzentration 0,45 imp/s pro % für die

Oszillationsperiode 6s und für die Oszillationsperiode 120s 0,36 imp/s pro %. Die Empfindlichkeit für die Änderungsrate ist 17 imp/s pro %/s bei 6s und 2,86 imp/s pro %/s bei 120s. Die doppelte Abhängigkeit sieht man in der Sensibilität des ORN der swA Sensille für die momentane Konzentration und die Änderungsrate. Auch der R^2 -Wert ($R^2 > 0,9$) zeigt einen linearen Zusammenhang der drei Werte. Doch gibt es zwischen den drei Oszillationsperioden keinen Unterschied für die Empfindlichkeit der momentanen Konzentration. Bei der swB1 Zelle kann man keinen Zusammenhang ausmachen da die Neigung der Ebenen zu beiden Seiten, besonders bei den langen Oszillationsperioden, flach ist. Auch der R^2 -Wert nimmt mit zunehmender Periodendauer ab (Abb. 6B). Hingegen zeigt das swB2 Neuron einen linearen Zusammenhang ($R^2 > 0,8$) und die Neigung der Ebenen weist auf eine doppelte Abhängigkeit für die beiden Parameter hin. Die Mittelwerte der swB2 ORN (Tab. 1) für die Empfindlichkeit der Änderungsrate zwischen der Oszillationsperioden 6 s und 120 s sind signifikant verschieden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Daten, die verwendet wurden, um die unterschiedliche Empfindlichkeit der swA- und der beiden swB-ORNs bei oszillierenden Konzentrationsänderungen zu bestimmen. Mittelwerte $\pm$ SD sind angegeben. Fettgedruckte Werte: statistisch signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen Mittelwerten basierend auf ANOVA (Tichy *et al.*, 2020).

Typen von ORN	swA			swB1			swB2		
Dauer der Sinusperiode, s	6	60	120	6	60	120	6	60	120
Bereich der getesteten Sinusamplitude, %	0 - 50			0 - 50			0 - 50		
Anzahl der verwendeten Perioden	10			6			7		
Anzahl der Regressionsebenen	10			6			7		
Anzahl der Punkte pro Ebene	30	300	600	30	300	600	30	300	600
Bestimmtheitsmaß, R^2	0,84 $\pm$ 0,16	0,64 $\pm$ 0,27	0,52 $\pm$ 0,29	0,83 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,21	0,42 $\pm$ 0,23	0,75 $\pm$ 0,26	0,61 $\pm$ 0,26	0,55 $\pm$ 0,29
Empfindlichkeit für Konzentration, (imp/s)/(%)	0,27 $\pm$ 0,17	0,20 $\pm$ 0,15	0,15 $\pm$ 0,13	0,21 $\pm$ 0,09	0,13 $\pm$ 0,07	0,10 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,07
Empfindlichkeit für Änderungsrate, (imp/s)/(%/s)	0,11 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,39	1,15 $\pm$ 0,90	0,27 $\pm$ 0,16	0,73 $\pm$ 0,40	1,33 $\pm$ 0,07	0,06 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,31	0,68 $\pm$ 0,26

In Tabelle 1 stehen die Mittelwerte der swA – und swB -Sensillen für sinusförmige Duftreize von drei verschiedenen Perioden. Bei dem ORN der swA findet man keine signifikanten Unterschiede bei der Antwort des Neurons und den Periodendauern, ebenso bei der ORN der swB1. Bei der swB2 unterscheidet sich die Empfindlichkeit für die Änderungsrate zwischen der kurzen und der längsten Sinusperiode.

3.2 Reaktionen der ORNs auf kontinuierliche Änderungen der Duftkonzentration

Bei jeder erfolgreichen Ableitung werden auch Duftreize mit unterschiedlich steilen rampen-förmiger Verlauf der Konzentrationsänderung getestet. Dabei steigt die

Konzentration konstant an und es kann der Einfluss verschiedener Geschwindigkeiten der Konzentrationsänderungen auf die Impulsfrequenz getestet werden. Der Duftreiz beginnt bei 0 % und steigt mit einer vorgegebenen Geschwindigkeit (Abb. 7 A), bildet bei 50% ein Plateau, hält dieses Niveau für einige Sekunden und fällt in derselben Geschwindigkeit wieder ab, jede dieser Rampen wurde dreimal wiederholt. Zur Auswertung werden die Änderungsraten von 50 %/s, 25 %/s und 5 %/s ausgewählt. Wie bei den sinusförmigen Duftreizen reagiert in den swA Sensillen nur eine der beiden ORNs (Abb. 7B) auf den Reiz. Zur späteren Auswertung wird das Neuron mit der größeren Amplitude herangezogen und in Pink dargestellt. In Abb. 7C ist zu erkennen, dass die Reaktion des Neurons mit dem Beginn des Duftreizes einsetzt. Für ein besseres Verständnis wird, der Verlauf der Duftkonzentration und die Impulsfrequenz aufgetragen (Abb. 7D). Die Reaktion des Neurons, gemessen in Impulse pro Sekunde, fällt bei den schnelleren Änderungsraten höher aus als bei der langsamsten.

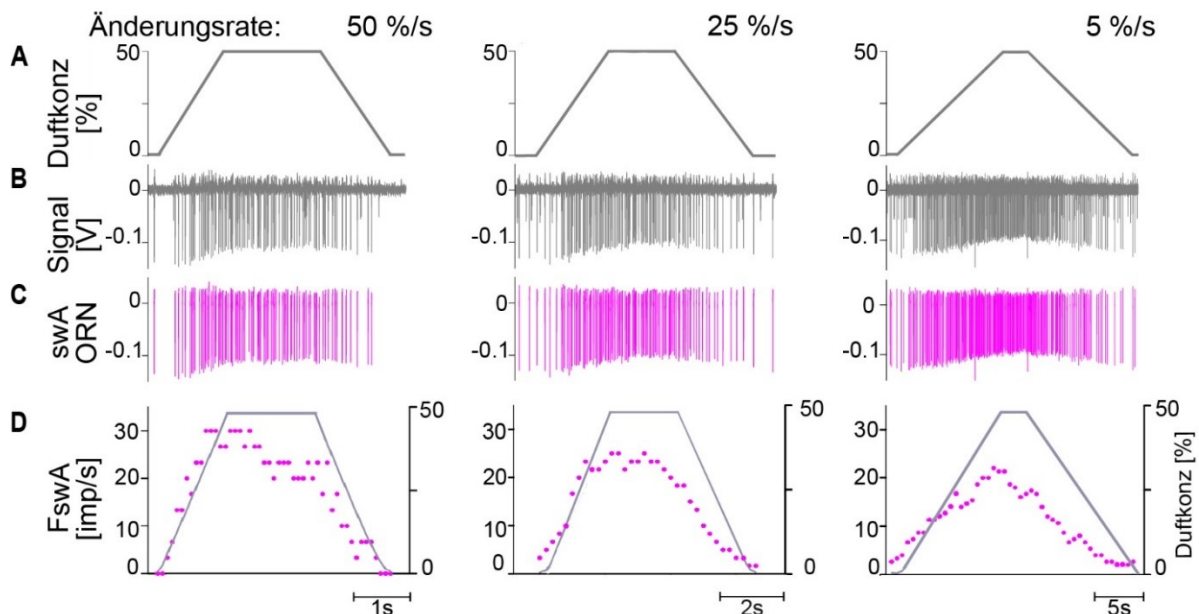


Abb. 7: **Originalregistrierung der Reaktion von ORNs in swA bei verschiedenen Geschwindigkeiten der rampenförmigen Änderungen der Duftkonzentration** (A) Zeitverlauf des Duftreizes, (B) Spannungssignal der beiden ORNs; (C) Diskriminierte Aktionspotentiale einer ORN (pink), (D) Zeitverlauf des Duftreizes und Impulsfrequenz (binsize 0,1 s in 50 %/s, 0,2 s in 25 %/s, 0,5 s in 5 %/s) (Tichy *et al.*, 2020)

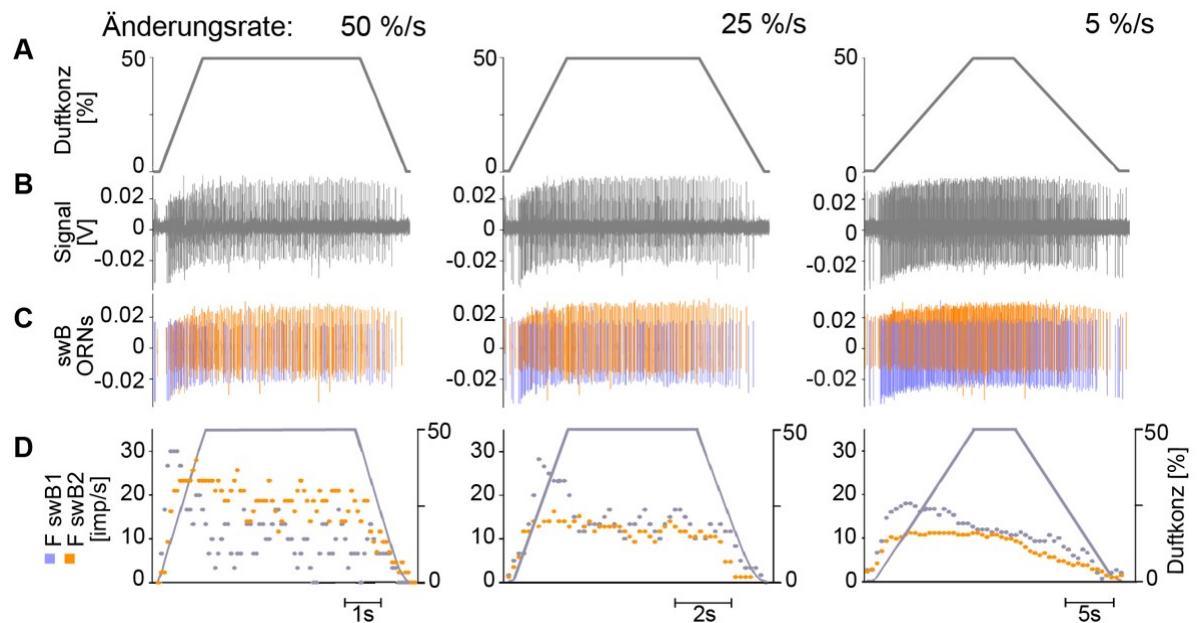


Abb.8: **Originalregistrierung der Reaktion von ORNs der swB Sensille bei verschiedenen Geschwindigkeiten der rampenförmigen Änderungen der Duftkonzentration** (A) Zeitverlauf des Duftreizes, (B) Spannungssignal der beiden ORNs; (C) Diskriminierte Aktionspotentiale beider ORNs swB1 (blau) swB2 (orange), (D) Zeitverlauf des Duftreizes und Impulsfrequenz (Zeitintervall 0,1 s in 50 %/s, 0,2 s in 25 %/s, 0,5 s in 5 %/s) (Tichy *et al.*, 2020)

Derselbe Versuch bei einer swB- Sensille zeigt, dass beide ORNs beim Einsetzen des Reizes ihre Impulsfrequenz erhöhen aber in unterschiedlichem Ausmaß. Das blaue swB1 Neuron hat anfänglich eine höhere Impulsfrequenz, sinkt aber bei den beiden schnelleren Reizen auch vor Erreichen des Duftmaximums wieder ab, kommt aber erst bei 0 % Duftkonzentration zur Ruhe. (Abb. 8D)

Bei der orangen swB2 Zelle löst der schnell ansteigende Duftreiz eine hohe Impulsfrequenz aus, bei den beiden langsameren Änderungsraten (25 %/s und 5 %/s) erreicht die Zelle nur einen niedriger Frequenzwert bei den Impulsen pro Sekunde. Bei allen drei Änderungsraten hält das ORN, dieses Niveau konstant bis zum Absinken der Duftkonzentration.

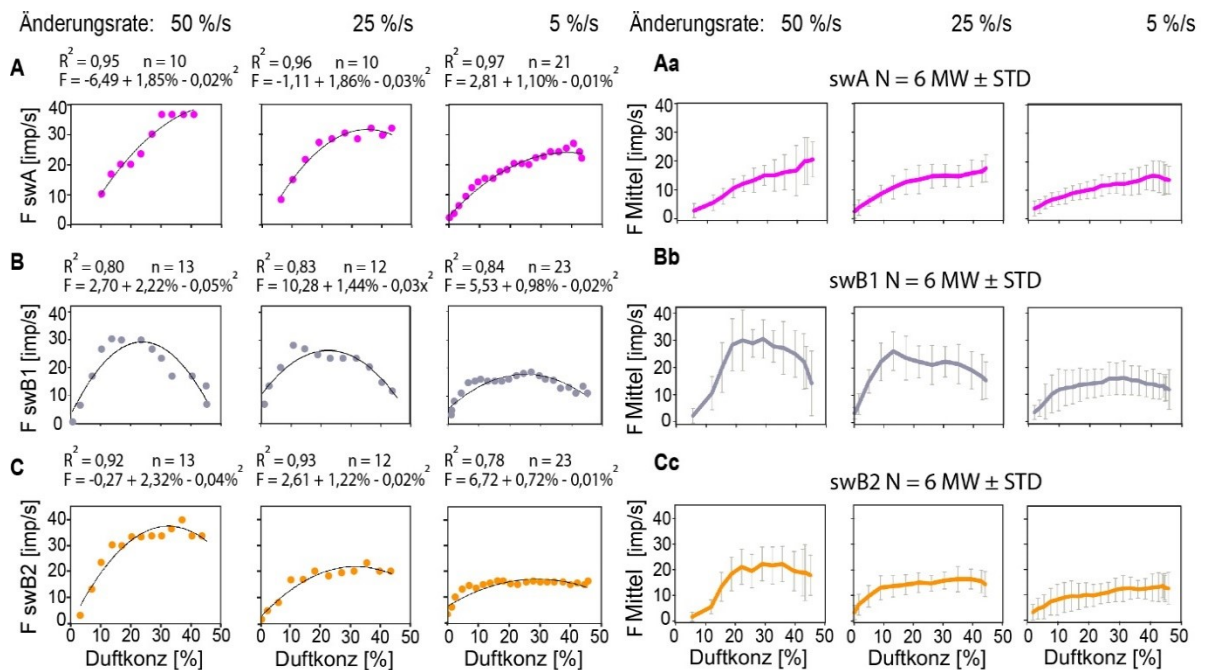


Abb. 9: **Impulsfrequenz der ORNs der swA und swB Sensillen geplotet als Funktion der momentanen Duftkonzentration.** Impulsfrequenzen eines einzelnen swA (A), swB1 (B) und swB2 (C) ORN während drei verschiedenen Änderungsraten, aufgetragen als Funktion gegen die Duftkonzentration. Es wird eine parabolische Regression verwendet. [$F = y + ax + bx^2$, wobei y die Höhe der Regressionsparabel ist, a die Neigung zur Konzentration, b die Neigung zur Impulsfrequenz]; Mittelwert und Standardabweichung von 6 swA (Aa), 6 swB1 (Bb) und 6 swB2 (Cc) ORNs. binsize 0,1 s in 50 %/s, 0,2 s in 25 %/s, 0,5 s in 5 %/s. (Tichy *et al.*, 2020)

In Abbildung 9 werden die Reaktionen der verschiedenen Zellen auf den rampenförmigen Anstieg des Duftreizes dargestellt. Die linke Spalte zeigt, dieselbe Beispiel - Reaktionen, wie in Abbildung 7 und 8. In Aa, Bb, Cc sieht man den Mittelwert und die Standardabweichung von je sechs Zellen der swA- Sensillen und je sechs Zellen der beiden ORNs der swB – Sensille. Die Reaktion auf den Anstieg der Rampe wurde genauer untersucht, da die Zellen alle unterschiedlich auf den Anstieg des Reizes reagierten. Im Einzelbeispiel und im Mittelwert, nimmt die Reaktion der ORN vor dem Maximum des Duftreizes ab.

Allgemein wird beobachtet, dass die maximale Entladungsrate höher ist desto schneller der Anstieg der Konzentration ist. Beim swA ORN sinkt mit abnehmender Geschwindigkeit das Maximum im Mittelwert von 33,4 imp/s auf 23,8 imp/s (Abb. 9Aa). Bei den beiden ORNs der swB Sensille sinkt das Maximum im Mittelwert von 32,5 imp/s auf 15,8 imp/s in dem swB1 ORN (Abb. 9.Bb) und im Mittelwert von 21,4 imp/s auf 14,2 imp/s im swB2 Neuron (Abb. 9Cc).

Je langsamer die Änderungsrate des Reizes ist desto länger wird die Zeit bis zum Frequenzmaximum. Im Falle des swA ORN im Mittelwert von 0,7 s auf 7,6 s, in dem swB1 ORN im Mittelwert 0,5 s auf 4,6 s und bei der swB2 Zelle im Mittelwert aller von 0,6 s auf 7,6 s.

Auch tritt das Frequenzmaximum unabhängig von der Änderungsrate bei verschiedener Momentan - Konzentration auf. Das Maximum der Frequenz trat im swA ORN im Mittelwert zwischen 32,8 % und 37,8 % (Abb. 9Aa). Im swB1 ORN im Mittelwert zwischen 22,1 % und 20,7 % (Abb. 9Bb) und im swB2 ORN Mittelwert 31,0 % und 38,1% (Abb. 9Cc). Zur Auswertung der einzelnen (9 A-C) als auch die gemittelten Daten (9 Aa – Cc) wird eine Parabel zu Hilfe genommen. Die Parabel zeigt graphisch den Einfluss der unabhängigen Variabel (Duftkonzentration) auf die abhängige Variabel (Impulsfrequenz). Das Bestimmtheitsmaß (R^2) gibt an wie gut die Parabel die unabhängige Variabel voraussagen kann.

Die Parabel wird in allen Einzelbeispielen und in den Mittelwerten flacher je langsamer die Änderungsrate ist. Die Streuung um die Parabel wird mit abnehmender Geschwindigkeit geringer.

Einzig die Daten der swA ORNs zeigen einen signifikanten Unterschied für die Sensibilität gegenüber der Konzentrationsänderung zwischen den drei unterschiedlichen Änderungsraten (Werte in Tabelle 2 hervorgehoben). Die gesamten Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Die Daten der einzelnen Parabeln wurden herangezogen, um das Auflösungsvermögen der ORNs zu berechnen.

Das Auflösungsvermögen gibt die Differenz zweier Reize an, um die ein Duftreiz größer sein muss, um vom ORN als getrennter Reiz erkannt zu werden. Für jede Zelle wird berechnet, ob die Zelle auf eine höhere Konzentration mit einer höheren Impulsfrequenz antwortet und wie groß der Unterschied sein muss, um eine veränderte Antwort zu erhalten.

Da sich das Auflösungsvermögen für die unterschiedlichen Konzentrationsänderungen nicht signifikant unterscheidet, werden die Werte gemittelt. (Tab. 2)

Das Auflösungsvermögen für die swA ORNs beträgt 7 %, das bedeutet zwei Duftreize müssen sich um 7 % unterscheiden, um in den swA ORNs eine veränderte Impulsfrequenz auszulösen und als getrennter Reiz erkannt zu werden.

Die ORNs der swB1 haben ebenfalls ein Auflösungsvermögen von 7 % und bei den ORNs der swB2 sind sogar 10 % nötig, um eine veränderte Impulsfrequenz hervorzurufen. (Tab. 2)

Anders ausgedrückt sind die swA und swB1 ORNs in der Lage den Konzentrationsbereich zwischen 0 % und 50 % in 7 Stufen zu unterteilen. Die swB2 ORNs sind weniger genau und können nur 5 Stufen unterscheiden. Die Anzahl der Stufen bleibt gleich bei verschiedenen Geschwindigkeiten der Konzentrationsänderung.

Dies deutet darauf hin, dass die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung wenig Einfluss auf die Leistung der swA und swB ORNs hat.

Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Daten, um die unterschiedliche Empfindlichkeit der swA- und der beiden swB-ORNs bei rampen-förmigen Konzentrationsänderungen und ihr Auflösungsvermögen zu bestimmen. Die Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die hervorgehobenen Werte sind signifikant ($p < 0,05$), der Unterschied wird mittels ANOVA berechnet (Tichy *et al.*, 2020).

Arten von ORN	swA			swB1			swB2		
Konzentrationsänderung, %/s	50	25	5	50	25	5	50	25	5
Getesteter Bereich, %	0 - 50			0 - 50			0 - 50		
Anzahl der parabolischen Regressionen	10			6			7		
Anzahl der Punkte pro Regression	11-13	10-12	21-23	11-13	10-12	21-23	11-13	10-12	21-23
Steigung der parabolischen Regressionen, <i>imp/s</i>	0,79 ±0,41	0,57 ±0,38	0,27 ±0,16	1,12 ±0,33	0,76 ±0,28	0,40 ±0,15	0,57 ±0,36	0,29 ±0,16	0,21 ±0,08
Abweichung der Antwort, <i>imp/s</i>	0,002 ±0,05	0,001 ±0,25	0,001 ±0,03	0,05 ±0,17	0,004 ±0,03	0,05 ±0,17	0,01 ±0,01	0,001 ±0,04	0,01 ±0,02
Bestimmtheitsmaß, R^2	0,90 ±0,07	0,92 ±0,04	0,87 ±0,14	0,82 ±0,08	0,72 ±0,21	0,82 ±0,11	0,81 ±0,12	0,84 ±0,13	0,80 ±0,20
<i>F max</i> , <i>imp/s</i>	33,42 ±19,0	31,25 ±17,5	23,80 ±13,5	32,51 ±8,21	27,28 ±7,88	15,83 ±5,36	21,46 ±7,85	15,30 ±3,17	14,17 ±3,82
Momentane Konzentration, bei der <i>Fmax</i> auftrat, %	32,79 ±8,85	33,42 ±9,64	37,78 ±6,24	22,05 ±8,28	15,07 ±4,32	20,67 ±8,85	31,02 ±12,7	36,35 ±9,86	38,07 ±6,27
Zeitintervall zw. Rampenbeginn und <i>Fmax</i> , s	0,73 ±0,15	1,42 ±0,36	7,60 ±1,39	0,49 ±0,10	0,83 ±0,29	4,61 ±1,56	0,63 ±0,26	1,51 ±7,60	7,60 ±1,65
Auflösungsvermögen, %	5,38 ±1,47	7,06 ±1,88	8,96 ±3,92	8,20 ±2,49	6,64 ±2,27	7,42 ±3,09	11,97 ±7,62	9,90 ±2,39	10,99 ±6,91
Gemittelttes Auflösungsvermögen für jede ORN, %		7,13 ±2,42			7,42 ±2,61			10,95 ±5,64	
Anzahl der Konzentrationsstufen, die ein ORN im Bereich von 0 - 50% unterscheiden kann		7			7			5	
Zeitintervall, das benötigt wird, um Stufen zu unterscheiden, s	0,14	0,28	1,42	0,16	0,33	1,66	0,2	0,4	2

4. Diskussion

Um einer Duftwolke zu folgen, nutzt die Schabe, ihr Geruchssystem, das aus einer großen Anzahl verschiedener Sensillentypen auf der Antenne besteht. Die ORNs diese Sensillen könnten die verschiedenen Parameter einer Duftwolke, wie Windrichtung, Identität des Duftes, Konzentration, Änderung in der Konzentration, detektiert, um sich erfolgreich in der Duftwolke zu orientieren.

In dieser Arbeit wurden die basikonischen Sensillen auf der Antenne der Schabe auf ihre Reaktion auf zwei Parameter einer Duftwolke getestet, die momentane Konzentration und Änderungsrate der Konzentration und mit dem bisherigen Wissen über die swC Sensille verglichen.

Die ORNs der beiden untersuchten Sensillentypen reagieren auf das Zitronenöl, obwohl in der swA Sensille, nur eines der beiden ORNs auf den Duft anspricht. Im Falle der swB Sensille reagieren beide auf unterschiedliche Weise auf den Reiz

4.1 Oszillierende Änderungsrate

Die Fluktuation in einer Duftwolke bestimmt die Reaktion des Tieres auf die Duftwolke (Murlis, 1992). Ein Reiz mit oszillierender Änderung der Konzentration haben eine sich ständig variierende Änderungsrate, sie können gut verglichen werden mit natürlich vorkommen Fluktuationen in einer Duftwolke.

Reizt man die ORNs der beiden Typen mit einer oszillierenden Konzentrationsänderung erhöhen sie beim Einsetzen des Duftreizes ihre Impulsfrequenz, je schneller der Duftreiz oszilliert desto höher ist Impulsfrequenz.

In Abbildung 4 und 5 sieht man die Impulsfrequenz und die Duftkonzentration gegen die Zeit aufgetragen, dies zeigt den Zusammenhang zwischen Anstieg und Abfall der Konzentration und Anstieg und Abfall der Impulsfrequenz. Die ORNs reagieren zeitlich nicht exakt auf den Reiz. Die Impulsfrequenzen erreichen vor dem Reiz das Maximum (Abb. 4 A, B und 5 A, B) in den Einzelbeispielen, ebenso wie in den Mittelwerten (Abb. 4 C und 5 C). Vor dem Maximum der Konzentration liegt das Maximum der Änderungsrate (Abb. 4D und 5D) und das Maximum der Impulsfrequenz liegt zwischen den beiden, es kommt also zu einer Phasenverschiebung. Die Impulsantwort der ORNs zeigt eine doppelte Abhängigkeit von der momentanen Konzentration und der Änderungsrate.

Um diese doppelte Abhängigkeit deutlich zu machen, wird die Impulsfrequenz gegen die Änderungsrate und die momentane Duftkonzentration aufgetragen (Abb. 6). Diese 3D Diagramme zeigen bei der Reaktion der swA ORNs einen starken linearen Zusammenhang ($R^2 > 0,9$) zwischen Impulsfrequenz, Änderungsrate und momentane Duftkonzentration. Die Leistung für die Änderungsrate der ORNs werden bei langsam oszillierenden Änderungen geringfügig höher als bei schnellen Änderungsraten und umgekehrt wird die Leistung für die momentane Konzentration bei schnellen Änderungsraten besser. (Tab. 1) Die ORNs der swB1 Sensille zeigen ähnliche Ergebnisse aber mit wesentlich schlechterem

linearem Zusammenhang ($R^2 < 0,6$). Die Mittelwerte der swB2 ORNs sind für die Empfindlichkeit gegenüber der momentanen Konzentration nahezu identisch zwischen den verschiedenen Änderungsraten, aber sie zeigen eine signifikant unterschiedliche Empfindlichkeit für die Änderungsrate zwischen der schnellsten und langsamsten Änderungsraten. Doch allgemein ist die Sensibilität bei swB2 ORNs für die Änderungsrate bei schneller Oszillation sehr gering, mit $0,06 \pm 0,08$ imp/s für die Änderung von 1 %/s und steigt bei der langsamsten Oszillation nur auf $0,68 \pm 0,28$ imp/s für die Änderung von 1 %/s.

Die ORNs der Sensillentypen zeigen also eine geringe doppelte Abhängigkeit von der Änderungsrate und der momentanen Konzentration. Die unterschiedliche oszillierenden Änderungsraten haben aber wenig Einfluss auf die Leistung der ORNs bei der Kodierung der momentanen Konzentration und der Änderungsrate.

4.2 Kontinuierliche Änderungsrate

Rampen- förmigen Änderungsraten haben einen konstanten Konzentrationsanstieg und somit eine konstante Änderungsrate, anders als bei oszillierenden Duftreizen, bei denen sich die Änderungsrate stetig ändert. Mit diesen Reizmodellen kann getestet werden wie genau ein ORN auf die Änderung in der Konzentration reagiert (Tichy *et al*, 2016). Kodieren die ORNs die Änderung in der Konzentration in der Änderung ihrer Impulsfrequenz und verbessert oder verschlechtert sich diese Sensibilität bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

Mit dem Anfang des Duftreizes erhöhen die ORNs beider Sensillentypen ihre Impulsfrequenz. Bei beiden Sensillen-Typen wird das Maximum der Reaktion vor dem Maximum des Reizes erreicht. Bei der swA ORN liegen die beiden Maxima nahe beieinander (Abb. 7) während bei den beiden swB ORNs die Impulsfrequenz vor dem Erreichen des Reizmaximums wieder absinkt (Abb.8). Besonders deutlich wird dies, wenn man nur den Anstieg des Reizes und die Reaktionen der ORNs mit Hilfe einer parabolischen Regression betrachtet (Abb. 9).

Die parabolische Regression zeigt den Zusammenhang zwischen dem kontinuierlichen Anstieg der Konzentration und dem Anstieg der Impulsfrequenz. Je schneller der Reiz präsentiert wird, desto höher ist die Impulsfrequenz, aber auch die Streuung um die Parabel nimmt zu, somit nimmt die Genauigkeit ab. Bei einem langsam ansteigenden Reiz ist die Kurve flacher und die Streuung weniger. Eine flachere Kurve bedeutet weniger Sensibilität für Konzentrationsänderung. Die Wiedergabe der Änderung in der Konzentration ist ungenau.

Das aus den Daten der Parabel, berechnete Auflösungsvermögen für jeden Sensillentyp ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Änderungsraten, deswegen wird der Mittelwert des Auflösungsvermögens für jedes ORN herangezogen (Tab. 2). Die ORNs zeigen nur eine gewisse Sensibilität auf die Änderung in der Konzentration, ihre Leistung ist aber nicht besser, wenn die Änderung langsam oder

schneller ist. Sie zeigen die Änderung der Konzentration unabhängig von der Änderungsgeschwindigkeit.

Die Schabe besitzt 74 000 Sensillen auf ihren langen Antennen, davon sind 8 %, (6000) swA– Sensillen, 54% (40 000) swB und 6% (4400) swC. Die swA und swB Sensillen sind über die ganze Antenne verteilt, während die swC Sensillen nur an den Segmenten an der Spitze der Antenne vorkommen, und nur vereinzelt am oberen und unteren Rand des Segments (Schaller, 1978).

In den vorangegangenen Arbeiten wurde die swC Sensille, mit demselben Reiz, Zitronenöl, auf diese Parameter getestet. In der Sensille ziehen zwei ORNs wenig verzweigt bis in die Spitze. (Schaller, 1978) Die beiden ORNs reagieren antagonistisch auf einen gegebenen Duftreiz, durch unterschiedliche Amplitudenhöhe der Aktionspotentiale können beide ORNs unterschieden werden und als „ON“ und „OFF“ bezeichnet werden. Das „ON“ ORN reagiert mit einem Anstieg ihrer Aktivität auf den einsetzenden Duftreiz und im Gegensatz dazu reagiert das „OFF“ ORN mit einem Ansteigen der Impulsfrequenz auf ein Abnehmen der Duftkonzentration. Dadurch erhält die Schabe Information über den zeitlichen Verlauf mit einem deutlichen Kontrast (Hinterwirth *et al.*, 2004; Tichy *et al.*, 2005; Burgstaller and Tichy, 2012, Tichy und Hellwig, 2018).

Die beiden ORNs der swC Sensille besitzen, bei oszillierenden Duftreizen, eine doppelte Abhängigkeit von der momentanen Konzentration und der Änderungsrate. Trifft die Sensille auf einen sich schnell ändernden Reiz erhöht sich die Sensibilität für die Konzentration. Treffen die Rezeptorneurone aber auf einen sich langsam ändernden Duftreiz erhöht sich die Sensibilität für die Änderungsrate (Tichy *et al.*, 2005; Burgstaller and Tichy, 2012, Tichy und Hellwig, 2018).

Bei kontinuierlich ansteigenden Duftreizen reagieren die ORNs der swC-Sensille ebenfalls mit einer antagonistischen Antwort. Das Auflösungsvermögen der „ON“ ORNs ist bei langsamen Änderungsraten, also wenn die Rampe flacher ansteigt, besser ausgeprägt als bei schnellem Anstieg. Die ORNs sind bei langsamen Änderungen in der Lage die Änderungen genauer aufzuzeigen.

Die ORNs beider basikonischen Typen haben keine antagonistische „ON“- und „OFF“-Reaktion, somit gibt es keinen Kontrast und eine weniger genaue Information über den zeitlichen Verlauf, wie in der swC Sensille. Auch haben die getesteten unterschiedlichen Änderungsraten keinen Einfluss auf die Reizantwort, die ORNs der swA und swB Sensille zeigt zwar eine doppelte Abhängigkeit von der momentanen Konzentration und der Änderungsrate aber wenig Unterschied zwischen den verschiedenen Geschwindigkeiten.

Bei kontinuierlichen Änderungsraten (rampen-förmig), verbessert sich das Auflösungsvermögen der swC Sensille, wenn der Reiz langsam steigt gegenüber einem schnellen Anstieg. Die beiden basikonischen Sensillen haben dasselbe Auflösungsvermögen bei einer Änderungsrate von 5 %/s, 25 %/s und 50 %/s. Die Änderungsrate hat keinen Einfluss auf die Sensibilität.

Auch folgt das „ON“-ORN der swC Sensille mit ihrer Reizantwort bis zum vollständigen Erreichen des Plateaus der Rampe beim Anstieg des Reizes (Tichy et. al. 2016). Während bei den beiden anderen Sensillentypen die Reaktion schon vor Erreichen des Maximums wieder absinkt. Dies ist, besonders deutlich in der Reaktion der beiden swB ORNs zu sehen.

Die beide ORNs der swB Sensille reagieren gleichzeitig auf den Duft des Zitronenöls, aber mit unterschiedlicher Stärke und unterschiedlichen zeitlichen Verlauf auf dieselbe Duftkonzentration.

Wie in Abbildung 8 D und 9 B, C zu sehen feuert die swB1 ORN höher und erreicht schneller das Maximum als die swB2 Zelle. Diese Reihenfolge bleibt auch immer gleich, wenn man auch die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung erhöht. Es könnte sein, dass beide auf einen Inhaltsstoff des Zitronenöl reagieren und mit ihrer individuellen Impulsfrequenz die Identität des Duftreizes kodieren.

Feststeht, dass die ORNs der drei Sensillentypen denselben Duftreiz auf unterschiedliche Weise kodieren.

Auch in der Weiterleitung der Information gibt es Unterschiede, die bei den beiden basikonischen Sensillen eingeht. Das Signal wird über ihre Axone in den antero -dorsalen Bereich des Antenallobus geleitet und erreichen über Projektionsneurone Typ 2 die äußere Zone des Pilzkörpers und des lateralen Hornes. Während die Information der swC Sensille über den postero- ventralen Teil des Antenallobus über Projektionsneuronen des Typ 1 in die innere Zone des Pilzkörpers und des lateralen Horns geleitet werden (Watanabe *et al.*, 2017). Die Information, die von der swC Sensille weitergeben wird, enthält Details über den zeitlichen Verlauf des Duftreize (Tichy und Hellwig, 2018).

Von anderen Insekten, wie der Honigbiene wissen wir, dass es zu einer parallelen Weiterleitung der Informationen über den Duft in höheren Hirnregionen gibt. Dabei ziehen auch, wie bei der Schabe, Axone der Antenne in verschiedenen Regionen des Antenallobus und dann über zwei unterschiedliche Wege (Projektionsneurone) zum Pilzkörper und lateralen Horn geleitet. Dabei reagieren die lateralen Projektionsneurone schnell und auf ein breites Spektrum an Düften und sind somit für die Information über den zeitlichen Verlauf des Dufts verantwortlich. Die medialen Projektionsneurone reagiert individueller auf einen Duftreiz und werden als Identifikationspfad angesehen (Brill, *et al.*, 2013; Carcaud *et al.*, 2015; Galizia und Rössler, 2010; Rössler und Brill, 2013).

Es steht fest, dass die ORNs der swC Sensillen die Änderungsrate in einer Duftfahne erkennen kann und die ORNs der swA und swB Sensillen wenig sensibel für die momentane Konzentration und die Änderung in der Konzentration sind.

Die unterschiedliche Reaktion der basikonischen und trichoiden Sensillen auf denselben Duftreiz, Zitronenöl, deuten daraufhin, dass eine für den zeitlichen Verlauf und die anderen für die Frage nach der Identität des Reizes verantwortlich sind.

Betrifft eine Schabe eine Duftwolke, hilft die swC Sensille mit ihren „ON“ und „OFF“ ORNs, die bei langsamer Änderung der Duftkonzentration sensibel auf die Änderungsrate und

bei schneller Änderung sensibel auf die Konzentration reagieren, der Duftwolke zu folgen (Burgstaller und Tichy, 2012). Während die ORNs der swA und swB Sensille, die unempfindlich gegenüber der Änderung in der Konzentration des Reizes ist, der Schabe Informationen über die Qualität des Duftreizes geben.

Anmerkung

Alle Daten und Abbildungen sind bereits veröffentlicht in "The performance of olfactory receptor neurons: the rate of concentration change indicates functional specializations in the cockroach peripheral olfactory system" von Tichy *et al.*, in Frontiers Physiology von 23. Dezember 2020. In dieser Veröffentlichung habe ich an allen wesentlichen Punkten mitgearbeitet. Das Thema der Arbeit wurde von meinem Betreuer gestellt, die Fragestellung wurde gemeinsam mit mir erarbeitet. Das Versuchsprotokoll wurde von mir gemeinsam mit Dr. Maria Hellwig geplant. Die Experimente wurden von mir durchgeführt, die Ergebnisse, Auswertungen und Bilder von mir erstellt und mit meinem Betreuer erörtert.

5. Literatur

Brill, M. F., Rosenbaum, T., Reus, I., Kleineidam, C. J., Nawrot, M. P., Rössler, W., (2013). Parallel processing via a dual olfactory pathway in the honeybee. *J. Neurosci.* 33, 2443–2456.

Burgstaller, M., und Tichy, H., (2012). Adaptation as a mechanism for gain control in cockroach ON and OFF olfactory receptor neurons. *European J. Neurosci* Vol. 35, pp. 519–526, doi:10.1111/j.1460-9568.2012.07989.x

Carcaud, J., Giurfa, M., and Sandoz, J. C., (2015). Parallel olfactory processing in the honey bee brain: odor learning and generalization under selective lesion of a projection neuron tract. *Front. Integr. Neurosci.* 9, 75. doi.org/10.3389/fnint.2015.00075.

Diem, C., und Lentner, K., (1970). *ScientificTables*. Basel, Ciba-Geigy Limited.

Fuscà, D. und Kloppenburg P., Odor processing in the cockroach antennal lobe—the network components *Cell and Tissue Research* 383:59–73 doi.org/10.1007/s00441-020-03387-3

Galizia, C. G. und Rössler, W., (2010). Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 399–420.

Hinterwirth A., Zeiner R., Tichy H., (2004) Olfactory receptor cells on the cockroach antennae: responses to the direction and rate of change in food odour concentration. *Eur J Neurosci* 19:3389–3392

Hellwig, M. und Tichy, H., (2016) Rising background odor concentration reduces sensitivity of ON and OFF olfactory receptor neurons for changes in concentration. *Frontiers in Physiology* 7(150) doi:10.3389/fphys.2016.00063

Lockey, J. K., und Willis, M. A., (2015). One antenna, two antennae, big antennae, small: total antennae length, not bilateral symmetry, predicts odor-tracking performance in the American cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* 218, 2156–2165. doi:10.1242/jeb. 117721

Loftus, R., and Corbière-Tichané, G. (1981). Antennal warm and cold receptors of the cave beetle, *Speophyes lucidulus* Delar, in sensilla with a lamellated dendrite. I. Response to sudden temperature change. *J. Comp. Physiol.* 143, 443–452. doi: 10.1007/BF00609911

Murlis, J., Elkinton, J. S., and Cardé, R. T., (1992). Odor plumes and how insects use them. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 505–532.

Moore, P. und Atema, J. (1988) A model of a temporal filter in chemoreception to extract directional information from a turbulent odor plume. *Biol. Bull.* 174: 355-363.

Rössler, W., and Brill, M. F., (2013). Parallel processing in the honeybee olfactory pathway: structure, function, and evolution. *J. Comp. Physiol. A* 199, 981–996.

Sass, H., (1978). Olfactory receptors on the antenna of *Periplaneta*. Response constellations that encode food odours. *J. Comp. Physiol. A* 128, 227–233.

Schaller, D., (1978). Antennal sensory system of *Periplaneta Americana* L. *Cell Tissue. Res.* 1014 191, 121–139.

Tichy H., Hinterwirth A., Gingl E., (2005) Olfactory receptors on the cockroach antenna signal odour ON and odour OFF by excitation. *Eur J Neurosci* 22:3147–316

Tichy, H., Hellwig, M., und Zopf, L. M., (2016). The rate of concentration change and how it determines the resolving power of cockroach olfactory receptor neurons. *Front. Physiol.* 7:645. doi.org/10.3389/fphys.2016.00645.

Tichy, H., Hellwig, M., (2018). Independent processing of increments and decrements in odorant concentration by ON and OFF olfactory receptor neurons. *J. Comp. Physiol. A* doi.org/10.1007/s00359-018-1289-6.

Tichy, H., Linhart, M.; Martzok A. und Hellwig, M, (2020) The performance of olfactory receptor neurons: The rate of concentration change indicates functional specializations in the cockroach peripheral olfactory system. *Front. Physiol.* 11:599086 doi.org/10.3389/fphys.2020.599086

Tichy, H., Zeiner, R., Traunmüller, P., Hellwig, M., Martzok, A., (2020) Developing and testing of an air dilution flow olfactometer with known rates of concentration change *Journal of Neuroscience Methods* 341:108794 doi:10.1016/j.jneumeth.2020.108794

Watanabe, H., Haupt, S. S., Nishino, H., Nishikawa, M., und Yokohari, F., (2012). Sensillum specific, topographic projection patterns of olfactory receptor neurons in the antennal lobe of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Comp. Neurol.* 520, 1687–1701.

Watanabe, H., Nishino, H., Mizunami, M., und Yokohari, F., (2017). Two parallel olfactory pathways for processing general odors in a cockroach. *Front. Neural Circuits*, doi.org/10.3389/fncir.2017.00032

Willis, M. A., and Avondet, J. L., (2005). Odor-modulated orientation in walking male cockroaches *Periplaneta americana*, and the effects of odor plumes of different structure. *J. Exp. Biol.* 208, 721–735.

Willis, M. A., Avondet, J. L., and Finnell, A. S., (2008). Effects of altering flow and odor information on plume tracking behavior in walking cockroaches, *Periplaneta americana* (L.). *J. Exp. Biol.* 211, 2317–2326