

# Zusammenfassung

## Einführung in die Echoortung und Fragestellung der Arbeit

Fledermäuse können sich akustisch mithilfe der Echoortung in kompletter Dunkelheit orientieren. Dabei stoßen sie Echoortungsrufe aus, die für den Menschen aufgrund der hohen Frequenz nicht hörbar sind. Diese Rufe werden an umliegenden Objekten reflektiert. Die daraus hervorgehenden Echos verwenden Fledermäuse, um ein akustisches Bild ihrer Umgebung zu erzeugen. Zeitliche und spektrale Echoeigenschaften hängen von Position und Art der umliegenden Objekte ab (Wohlgemuth et al. 2016b). Die Informationen eines Echos entsprechen einer Momentaufnahme der Umgebung, ähnlich wie ein Einzelbild eines Films. Fledermäuse stoßen Echoortungsrufe mit einer hohen Wiederholungsrate aus, um eine hohe räumliche Auflösung zu erhalten. Die daraus hervorgehenden Echos werden zeitlich integriert, wodurch eine kontinuierliche Repräsentation der Umgebung entsteht (Simmons 2012; Moss and Surlykke 2001, 2010).

Für Kollisionsfreie Flüge ist eine exakte Berechnung der Distanz zu umliegenden Objekten entscheidend. Fledermäuse ermitteln die Distanz mithilfe der sogenannten Echo-Verzögerung (Kössl et al. 2014; Wohlgemuth et al. 2016b). Die Echo-Verzögerung entspricht der Dauer vom Rufausstoß bis zum Empfang des Echos und hängt von der Distanz ab, die beide Signale zurücklegen müssen. Neurone, die selektiv auf bestimmte Echo-Verzögerungen antworten, sogenannte „*delay-tuned neurons*“, findet man entlang der aufsteigenden Hörbahn ab dem auditorischen Mittelhirn (colliculus inferior = IC; Wenstrup et al. 2012; Macías et al. 2016). In der Regel werden „*delay-tuned neurons*“ mithilfe von künstlichen Stimuli, die nur einen Teil des natürlichen Echoortungsrufes und des Echos widerspiegeln untersucht (Kössl et al. 2014). Dabei werden die Stimuli dem Tier als Ruf-Echo Paare mit randomisierten Echo-Verzögerungen präsentiert. Da Echoortungsrufe jedoch mit hoher Rate ausgestoßen werden, wäre es nicht verwunderlich, wenn die zeitliche Struktur einer Echoortungssequenz entscheidend für die neuronale Verarbeitung ist. Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Stimulusrate bei Neuronen des ICs und des auditorischen Kortex (AC) eine selektivere Reaktion auf unterschiedliche Stimulus-Parameter auslösen (Bartenstein et al. 2014; Galazyuk et al. 2000; Wong et al. 1992; Zhou and Jen 2006; Wu and Jen 1996; Chen and Jen 1994). Allerdings wurden dabei künstliche Echoortungssequenzen als Stimuli verwendet. Daher war das Hauptziel dieser Arbeit die neuronale Verarbeitung natürlicher Echoortungssequenzen im IC und im AC der fruchtessenden Fledermaus *Carollia perspicillata* zu untersuchen. Neben dem vergleichenden Ansatz der neuronalen Verarbeitung zwischen IC und AC untergliedert sich die Arbeit in drei Teilfragen. Im Ersten Teil untersuchte ich, welchen Einfluss der zeitliche Kontext einer natürlichen Echoortungssequenz auf die neuronale Verarbeitung hat. Im Zweiten Teil untersuchte ich, wie Echoortungssequenzen, die Informationen von bis zu drei Objekten beinhalten neuronal verarbeitet werden. Dabei richtete sich das Hauptaugenmerk darauf, ob die Neurone Echoinformationen aller Objekte oder nur von jeweils einem Objekt verarbeiten. Im dritten Teil

meiner Arbeit untersuchte ich den Einfluss einer Beschallung mit Echoortungssignalen auf das Echoortungsverhalten einer Fledermaus. Auch wurde die Robustheit neuronaler Antworten auf eine Echoortungssequenz bei Anwesenheit von weiteren Echoortungssignalen anderer Artgenossen analysiert. Die Ergebnisse des dritten Teils könnten erklären, wie eine Echoortung in Anwesenheit mehrerer Fledermäuse möglich ist.

### **Schaukel-Paradigma: Tonaufnahmen natürlicher Echoortungssequenzen**

Für die Aufnahme natürlicher Echoortungssequenzen wurde die Fledermaus in einer Schaukel positioniert (Henson et al. 1982). Durch Schwingen der Schaukel wurde der Fledermaus eine Flugsequenz von 4 m simuliert. Währenddessen stößt die Fledermaus Echoortungssignale aus, welche an umliegenden Objekten reflektiert werden. Um die Rufe und Echos aufzunehmen wurde ein im Ultraschallbereich empfindliches Mikrophon an der schwingenden Schaukel befestigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Abstand des Mikrofons zu den Ohren des Tieres maximal 4 cm betrug. Durch Positionieren verschiedener Objekte in die Flugbahn der Schaukel konnten Echoquellen manuell bestimmt werden.

Mithilfe dieses Paradigmas wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Stimulus-Szenarien simuliert. Für die Aufnahme einer „*simplen*“ Echoortungssequenz wurde eine Plexiglasplatte so positioniert, dass die Fledermaus am Ende der Vorwärtsschwingung etwa 30 cm vor der Platte zum Stehen kam. Die während der Vorwärtsschwingung aufgenommene Echoortungssequenz entsprach einem Stimulus-Szenario, das die Fledermaus erfahren würde, wenn sie ein statisches Objekt anfliegt. Bei der „*multiple-object*“ Echoortungssequenz waren zwei weitere Objekte vorhanden. Objekt A, ein Fels aus Pappmaché, war vom Startpunkt der Schwingung 2,70 m entfernt und wurde von der Schaukel überschwungen, was der Fledermaus ein Überfliegen eines Objekts simuliert. In einer Entfernung von 1,30 m hinter Objekt A befand sich Objekt B, eine quadratische Holzplatte in einer Höhe von 1,10 m. Objekt B wurde so positioniert, dass die schwingende Schaukel mit der Fledermaus 10 cm davor zum Stillstand kam. 20 cm hinter Objekt B befand sich Objekt C, die Plexiglasplatte aus der „*simplen*“ Echoortungssequenz. Durch das Positionieren der drei Objekte in unterschiedlichen Distanzen folgten jedem Echoortungsruf mindestens zwei objektspezifische Echos. Die physikalischen Rufparameter der in der Schaukel aufgenommenen Echoortungssequenzen entsprachen den Signalparametern von freifliegenden Fledermäusen der Art *C. perspicillata* (Thies et al. 1998).

## **Echoortungssequenzen evozieren neuronale Suppression, die die Selektivität der neuronalen Antwort auf bestimmte Ruf-Echo Paare erhöht! (Beetz et al. 2016b; Beetz et al. submitted A)**

Rasch aufeinanderfolgende Stimuli evozieren in der Regel eine neuronale Suppression, wodurch die Neurone schwach bis gar nicht auf nachfolgende Stimuli reagieren (Wehr and Zador 2005; Brosch and Schreiner 1997; Kilgard and Merzenich 1998; Calford and Semple 1995). Die Ruftrate von *C. perspicillata* liegt im Bereich zwischen 10 und 40 Hz (Thies et al. 1998). Unter Berücksichtigung von Echos sind akustische Raten zwischen 20 und 80 Hz möglich. Um den Einfluss der akustischen Rate einer natürlichen Echoortungssequenz auf die neuronale Verarbeitung zu testen, wurde die „*simple*“ Echoortungssequenz in ihre einzelnen Ruf-Echo Paare zerlegt. Diese Ruf-Echo Paare wurden einer anästhesierten Fledermaus randomisiert mit einer akustischen Rate von 2.5 Hz vorgespielt („*element situation*“), während die neuronale Aktivität von IC oder AC aufgenommen wurde. Zusätzlich wurde die Fledermaus mit der natürlichen Echoortungssequenz stimuliert („*sequence situation*“). Durch Vergleichen der neuronalen Antworten in der „*element*“ und „*sequence situation*“ wurde gezeigt, dass Neurone beider Hirnareale während der „*sequence situation*“ supprimiert wurden. Trotz Suppression konnten Neurone im IC auf jedes akustische Signal in der Echoortungssequenz antworten und die Aktionspotentiale waren zeitlich zum Stimulus synchronisiert. Die Suppression war für die zeitliche Verarbeitung der Echoortungssequenz förderlich, da sie die Rate zwischen dem Signal und dem Rauschen („*signal-to-noise ratio*“) signifikant erhöht hat. Außerdem reagierten Neurone des ICs in der „*sequence situation*“ selektiver auf bestimmte Ruf-Echo Paare als in der „*element situation*“.

Im AC ist die Suppression ebenfalls für die zeitliche Verarbeitung der Echoortungssequenz förderlich. Die kortikalen Neurone antworteten in der „*sequence situation*“ ebenfalls selektiver auf bestimmte Ruf-Echo Paare als in der „*element situation*“. Während der „*sequence situation*“ erholten sich die kortikalen Neurone teilweise von der Suppression und antworteten selektiv auf bestimmte Ruf-Echo Paare. „*Delay-tuned neurons*“ sind im Kortex entlang der rostro-caudalen Achse topografisch angeordnet (Chronotopie; Hagemann et al. 2010). Mithilfe von selbstgebauten Glas-Multielektroden war ich in der Lage, von bis zu acht Neuronen zeitgleich abzuleiten. So konnte ich die Organisation der Chronotopie charakterisieren während die Fledermaus mit natürlichen Echoortungssequenzen stimuliert wurde. Die durch die „*sequence situation*“ evozierte Suppression und die daraus folgende selektive neuronale Antwort auf bestimmte Ruf-Echo Paare führten dazu, dass die Chronotopie eindeutiger war als in der „*element situation*“.

**Mittelhirnneurone können Echos mehrerer Objekte parallel verarbeiten, wohingegen kortikale Neurone lediglich Echos vom nächstgelegenen Objekt verarbeiten! (Beetz et al. 2016a; Beetz et al. submitted A)**

Die natürliche Umgebung von Fledermäusen besteht in der Regel nicht nur aus einem Objekt. Echoortungsrufe werden von mehreren umliegenden Objekten reflektiert, wodurch mehrere Echos einem Ruf folgen (Moss and Surlykke 2010). In dieser Arbeit habe ich die neuronale Verarbeitung unter solchen Bedingungen getestet, indem ich anästhesierte Fledermäuse mit der „*multiple-object*“ Echoortungssequenz beschallt habe. Um herauszufinden, welches Objekt die neuronale Antwort auf diese Sequenz am Stärksten beeinflusst, wurde die „*multiple-object*“ Echoortungssequenz in drei „*single-object*“ Echoortungssequenzen umgewandelt. Hierfür wurden manuell die Echos von zwei Objekten gelöscht. Beispielsweise wurde durch das Löschen der Echos von Objekt B und Objekt C eine „*single-object*“ Echoortungssequenz erstellt, die nur Echos von Objekt A beinhaltete. Drei „*single-object*“ Echoortungssequenzen und die „*multiple-object*“ Echoortungssequenz wurden dem Tier präsentiert und die entsprechenden neuronalen Antwortmuster miteinander verglichen.

Da Neurone im IC relativ schwach supprimiert werden, reagierten sie auf alle Echos der „*multiple-object*“ Echoortungssequenz. Allerdings fiel auf, dass in etwa 72% der Neurone Objekt B den stärksten Einfluss auf die neuronale Antwort hatte. Dieses Ergebnis war teilweise darauf zurückzuführen, dass die meisten Echos der „*multiple-object*“ Echoortungssequenz von Objekt B stammten. Im AC dagegen reagierten die Neurone aufgrund der starken Suppression ausschließlich auf Echos des nächstgelegenen Objekts. Bei der Aufnahme der „*multiple-object*“ Echoortungssequenz hat die schaukelnde Fledermaus Objekt A nach etwa der Hälfte der Schwingung passiert, sodass nur noch Echos von Objekt B und Objekt C in der restlichen Sequenz repräsentiert waren. Dadurch war ab der zweiten Hälfte der „*multiple-object*“ Echoortungssequenz Objekt B das nächstgelegene Objekt zum Tier. In der ersten Hälfte der „*multiple-object*“ Echoortungssequenz reagierten Neurone im IC und AC verstärkt auf Objekt A, wohingegen sie in der zweiten Hälfte der Sequenz verstärkt auf Objekt B reagierten. Zusammenfassend verhindert die neuronale Suppression, dass Echos aller Objekte gleichermaßen verarbeitet werden. Verhaltensbiologisch ist die übergeordnete Verarbeitung des nächstgelegenen Objekts wichtig, um Kollisionen zu vermeiden.

## **In geräuschvoller Umgebung erhöht *C. perspicillata* die Ruftrate, um eigene Echoortungssignale neuronal besser verarbeiten zu können! (Beetz et al. submitted B)**

Mithilfe der Echoortung können sich Tiere unabhängig von äußeren Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel Lichtverhältnissen, orientieren. Allerdings müssen sie ihre eigenen Echoortungssignale von denen ihrer Artgenossen unterscheiden. Jedes akustische Signal kann potentiell mit den eigenen Echoortungssignalen der Fledermaus interferieren. In der Vergangenheit wurden einige Verhaltensanpassungen als Antwort einer solchen Situation beschrieben (siehe Übersichtsartikel von; Ulanovsky and Moss 2008). Allerdings wurde neurophysiologisch bisher noch nicht getestet, ob diese Anpassungen die neuronale Verarbeitung verhaltensrelevanter Signale erleichtert. Da bisher noch keine Verhaltensanpassungen auf Beschallungen in *C. perspicillata* beschrieben worden sind, untersuchte ich durch Beschallungsexperimente in einem Flugraum, ob und wie *C. perspicillata* das Echoortungsverhalten anpasst. Während der Beschallung stößte *C. perspicillata* ihre Rufe verstärkt in Gruppen aus. Dabei verringerte sie die Rufpausen innerhalb der Gruppe, wodurch die Rufgruppen zeitlich konzentrierter waren als die Rufgruppen, die ohne Beschallung ausgestoßen worden sind. Die erhöhte Ruftrate innerhalb einer Gruppe scheint sinnvoll, da sie die räumliche Auflösung der empfangenen Echos erhöhen würde. Dadurch könnte der Wegfall einiger Echoinformationen durch akustische Interferenzen kompensiert werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorangegangenen neurophysiologischen Experimente ist es fraglich, ob eine Erhöhung der Ruftrate die neuronale Verarbeitung vereinfacht. Schließlich könnte eine Erhöhung der Ruftrate auch eine Verstärkung der neuronalen Suppression nach sich ziehen. Daher wurde der Einfluss der akustischen Interferenzen (Maskierer) in Form von Echoortungssignalen anderer Tiere auf die neuronale Verarbeitung der „*simplen*“ Echoortungssequenz untersucht. Trotz Maskierer konnten Neurone im IC auf die „*simple*“ Echoortungssequenz antworten. Im Vergleich dazu bewirkten die Maskierer im AC eine Erhöhung der neuronalen Suppression, wodurch die neuronale Selektivität ebenfalls erhöht wurde. Dadurch waren die Neurone weniger anfällig auf Interferenzen und konnten Informationen der „*simplen*“ Echoortungssequenz verarbeiten. Zusammenfassend wäre eine Erhöhung der Ruftrate auf Antwort von akustischen Interferenzen eine geeignete Anpassung, um eine neuronale Verarbeitung einer „*simplen*“ Echoortungssequenz zu sichern.

## **Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die natürliche zeitliche Struktur der Stimuli die neuronale Verarbeitung entscheidend bestimmt. Die natürlichen Echoortungssequenzen bewirkten eine neuronale Suppression, die sich vom IC zum AC erhöht. In beiden Hirnarealen erhöht die Suppression die neuronale Selektivität auf bestimmte Ruf-Echo Paare der Echoortungssequenz. Im Gegensatz zum AC wird im IC die neuronale Antwort auf die akustischen Signale der Echoortungssequenz nicht völlig supprimiert, sodass die Aktionspotentiale im IC zeitlich an dem Stimulus synchronisiert sind. Der IC kann so den zeitlichen Verlauf von Echoortungssequenzen detailliert repräsentieren. Die zeitliche Verarbeitung wird auch bei höheren akustischen Raten, wie durch das Hinzufügen von Echoinformationen mehrere Objekte oder durch Maskierer nicht negativ beeinflusst. Im Gegensatz zum IC ist die Suppression im AC stärker. Die Suppression agiert auch auf kortikaler Ebene als Selektionsfilter und bewirkt, dass Neurone während der Stimulation mit einer Echoortungssequenz massiv supprimiert werden. Nur in Antwort auf bestimmte Ruf-Echo Paare erholen sich die Neurone von der Suppression und können diese so selektiv verarbeiten. Die starke Suppression bewirkt außerdem, dass primär Echos vom nächstgelegenen Objekt verarbeitet werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die zeitliche Verarbeitung von rasch aufeinanderfolgenden Stimuli nicht zwingend durch das Einwirken der neuronalen Suppression verschlechtert wird. Die Suppression agiert vielmehr als Filter und gewährleistet eine selektive Verarbeitung bestimmter sensorischer Informationen innerhalb einer Sequenz.

Ebenso zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass nicht nur natürliche Stimuli in zukünftigen neurophysiologischen Studien berücksichtigt werden sollten, sondern diese auch in einem natürlichen zeitlichen Kontext dem zu untersuchenden Tier präsentiert werden sollten. Unter natürlichen Verhaltensbedingungen verarbeiten sensorische Systeme in der Regel keine zeitlich voneinander isolierten Stimuli, sondern vielmehr eine Abfolge von Stimuli.

## Summary

Echolocation allows bats to orientate in darkness without using visual information. Bats emit spatially directed high frequency calls and infer spatial information from echoes coming from call reflections in objects (Simmons 2012; Moss and Surlykke 2001, 2010). The echoes provide momentary snapshots, which have to be integrated to create an acoustic image of the surroundings. The spatial resolution of the computed image increases with the quantity of received echoes. Thus, a high call rate is required for a detailed representation of the surroundings.

One important parameter that the bats extract from the echoes is an object's distance. The distance is inferred from the echo delay, which represents the duration between call emission and echo arrival (Kössl et al. 2014). The echo delay decreases with decreasing distance and delay-tuned neurons have been characterized in the ascending auditory pathway, which runs from the inferior colliculus (Wenstrup et al. 2012; Macías et al. 2016; Wenstrup and Portfors 2011; Dear and Suga 1995) to the auditory cortex (Hagemann et al. 2010; Suga and O'Neill 1979; O'Neill and Suga 1982).

Electrophysiological studies usually characterize neuronal processing by using artificial and simplified versions of the echolocation signals as stimuli (Hagemann et al. 2010; Hagemann et al. 2011; Hechavarría and Kössl 2014; Hechavarría et al. 2013). The high controllability of artificial stimuli simplifies the inference of the neuronal mechanisms underlying distance processing. But, it remains largely unexplored how the neurons process delay information from echolocation sequences. The main purpose of the thesis is to investigate how natural echolocation sequences are processed in the brain of the bat *Carollia perspicillata*. Bats actively control the sensory information that it gathers during echolocation. This allows experimenters to easily identify and record the acoustic stimuli that are behaviorally relevant for orientation. For recording echolocation sequences, a bat was placed in the mass of a swinging pendulum (Kobler et al. 1985; Beetz et al. 2016b). During the swing the bat emitted echolocation calls that were reflected in surrounding objects. An ultrasound sensitive microphone traveling with the bat and positioned above the bat's head recorded the echolocation sequence. The echolocation sequence carried delay information of an approach flight and was used as stimulus for neuronal recordings from the auditory cortex and inferior colliculus of the bats.

Presentation of high stimulus rates to other species, such as rats, guinea pigs, suppresses cortical neuron activity (Wehr and Zador 2005; Creutzfeldt et al. 1980). Therefore, I tested if neurons of bats are suppressed when they are stimulated with high acoustic rates represented in echolocation sequences (sequence situation). Additionally, the bats were stimulated with randomized call echo elements of the sequence and an interstimulus time interval of 400 ms (element situation). To quantify neuronal suppression induced by the sequence, I compared the response pattern to the sequence situation with the concatenated response patterns to the element situation. Surprisingly, although the bats should be adapted for processing high acoustic rates, their cortical neurons are vastly suppressed in the sequence situation (Beetz et al. 2016b). However, instead of being completely suppressed

during the sequence situation, the neurons partially recover from suppression at a unit specific call echo element. Multi-electrode recordings from the cortex allow assessment of the representation of echo delays along the cortical surface. At the cortical level, delay-tuned neurons are topographically organized. Cortical suppression improves sharpness of neuronal tuning and decreases the blurriness of the topographic map. With neuronal recordings from the inferior colliculus, I tested whether the echolocation sequence also induced neuronal suppression at subcortical level. The sequence induced suppression was weaker in the inferior colliculus than in the cortex. The collicular response makes the neurons able to track the acoustic events in the echolocation sequence. Collicular suppression mainly improves the signal-to-noise ratio. In conclusion, the results demonstrate that cortical suppression is not necessarily a shortcoming for temporal processing of rapidly occurring stimuli as it has previously been interpreted.

Natural environments are usually composed of multiple objects. Thus, each echolocation call reflects off multiple objects resulting in multiple echoes following the calls. At present, it is largely unexplored how neurons process echolocation sequences containing echo information from more than one object (multi-object sequences). Therefore, I stimulated bats with a multi-object sequence which contained echo information from three objects. The objects were different distances away from each other. I tested the influence of each object on the neuronal tuning by stimulating the bats with different sequences created from filtering object specific echoes from the multi-object sequence. The cortex most reliably processes echo information from the nearest object whereas echo information from distant objects is not processed due to neuronal suppression. Collicular neurons process less selectively echo information from certain objects and respond to each echo.

For proper echolocation, bats have to distinguish between own biosonar signals and the signals coming from conspecifics. This can be quite challenging when many bats echolocate adjacent to each other. In behavioral experiments, the echolocation performance of *C. perspicillata* was tested in the presence of potentially interfering sounds. In the presence of acoustic noise, the bats increase the sensory acquisition rate which may increase the update rate of sensory processing. Neuronal recordings from the auditory cortex and inferior colliculus could strengthen the hypothesis. Although there were signs of acoustic interference or jamming at neuronal level, the neurons were not completely suppressed and responded to the rest of the echolocation sequence.