

## Zusammenfassung

Adenylatzyklasen (ACs) synthetisieren den intrazellulären Botenstoff 3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Die physiologische Bedeutung der ACs wird im Gehirn von Säugetieren und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* intensiv untersucht. Es wurde festgestellt, dass einige Isoformen des Enzyms für Lern- und Gedächtnisprozesse benötigt werden. Ein Organismus, der sich als „Lernmodell“ besonders gut eignet, ist die Honigbiene *Apis mellifera*. Sie besitzt ein umfangreiches Verhaltensrepertoire, das für Lernexperimente leicht zugänglich ist. Testverfahren, mit denen visuelles, olfaktorisches und taktiler Lernen analysiert werden können, sind seit langem etabliert und werden stetig erweitert. Allerdings sind die zellulären und molekularen Grundlagen, die das Verhalten der Honigbiene steuern, weitgehend unerforscht. Über die molekulare und biochemische Identität der ACs in der Honigbiene, war zu Beginn meiner Arbeit nichts bekannt.

Ich habe drei Gene kloniert (*Amac2*, *Amac3* und *Amac8*), die für membranständige ACs der Honigbiene kodieren. Die Aminosäuresequenzen besitzen große Ähnlichkeit zu ACs aus Säugetieren und *Drosophila*. Die heterolog exprimierten Enzyme AmAC2t und AmAC3 werden durch Forskolin und die  $\alpha$ -Untereinheit stimulatorischer G-Proteine ( $G_s\alpha$ ) aktiviert. Das *Amac2*-Gen kodiert für ein N-terminal trunkeertes Protein (AmAC2t). Es ist das erste, trunkeerte AC-Enzym, das funktionell exprimiert werden konnte.

Das *Amac3*-Gen wird im Gehirn der Honigbiene exprimiert. Die mRNA wurde in Neuronen der Pilzkörper, der optischen Loben und des Deutocerebrums nachgewiesen. Um die *in vivo* Funktion der AmAC3 zu untersuchen, sollte die *Amac3*-Genexpression im Gehirn von Honigbienen unterdrückt werden. Eine Chance, die Genexpression in der Honigbiene zu beeinflussen, bietet der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi). Der selektive mRNA-Abbau sollte induziert werden, indem Honigbienen *Amac3*-spezifische, doppelsträngige RNA (dsRNA) injiziert wurde. Diese Tiere reagierten empfindlicher auf Zucker als Kontrolltiere. Demzufolge ist die AmAC3 in neuronale Signalwege eingebunden, die die gustatorische Empfindlichkeit beeinflussen. Interessanterweise besaßen Tiere, denen *Amac3* dsRNA injiziert wurde, mehr *Amac3*-mRNA als Kontrolltiere. Dieses Ergebnis überraschte und führte zu einer alternativen Interpretation der RNAi-Auswirkung. Weiterführende Experimente sind notwendig, um herauszufinden, wie der RNAi-Mechanismus in der Honigbiene tatsächlich abläuft, analysiert und als Methode etabliert werden kann.

## Abstract

Adenylyl cyclases (ACs) are enzymes that synthesize the intracellular messenger adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP). The physiological impact of ACs has been intensively investigated in the mammalian brain and in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. Some of the AC-enzymes are involved in processes underlying learning and memory. An organism, which is well suited for learning studies, is the honeybee *Apis mellifera*. The bee provides a rich behavioral repertoire that can be experimentally addressed. Within the last decades, several tests to study visual, olfactory, and tactile learning skills of the honeybee have been established. However, the cellular mechanisms and molecular components controlling the bees' behavior are largely unknown. In the beginning of this study, the molecular and biochemical properties of adenylyl cyclases in the bee had not been uncovered.

I have cloned three genes (*Amac2*, *Amac3*, and *Amac8*) that encode membrane-bound ACs from honeybee brain. The amino-acid sequences have striking similarities to ACs from mammals and *Drosophila*. Heterologously expressed AmAC2t and AmAC3 proteins are activated by forskolin as well as by  $\alpha$ -subunits of stimulatory G-proteins ( $G_s\alpha$ ). The *Amac2*-gene encodes an N-terminally truncated protein (AmAC2t). Notably, AmAC2t is the first truncated AC-enzyme that could be functionally expressed.

The expression profile of the *Amac3* gene was analyzed by *in situ* hybridization of brain-tissue sections. The *Amac3* mRNA is predominately expressed in the mushroom bodies, the optic lobes, and the deutocerebrum. To analyze the *in vivo* function of AmAC3, the expression of the *Amac3* gene should be suppressed in the brain. To pursue such analyses, RNA interference (RNAi) is a promising technique. When *Amac3*-specific, double-stranded (ds) RNA is introduced into the honeybee brain, the endogenous *Amac3* mRNA-level should be reduced. Bees that were injected with *Amac3*-dsRNA exhibited a higher responsiveness to sugar compared to controls. These results suggest that AmAC3 modulates the gustatory sensitivity of the animal. Interestingly, the injected bees had a higher amount of *Amac3* mRNA than control bees. This unexpected finding evoked an alternative interpretation of the RNAi-effect. Further experiments are necessary, however, to uncover how the RNAi mechanism in the honeybee really works and to establish this method as a reliable tool to study gene function in this insect.