

Zusammenfassung

HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels*) sind Ionenkanäle, die in zellulären Netzwerken spontane rhythmische Aktivitätsmuster vermitteln können. Sie werden deshalb auch Schrittmacherkanäle genannt. In dieser Arbeit konnte erstmals das Expressionsmuster von vier HCN-Kanalisoformen (HCN1 - HCN4) im olfaktorischen Epithel auf subzellulärer Ebene bestimmt werden. Die Isoformen HCN1 und HCN2 werden in olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) exprimiert. Die Proteine sind in den Dendriten der ORN lokalisiert, besonders starke Immunreaktivität wurde aber auch in den Axonen der ORN nachgewiesen. Die Isoform HCN4 war ausschließlich in den Axonen vorhanden. Durch die immunhistochemischen Färbungen wurden zwei morphologisch unterschiedliche Axonbündeltypen identifiziert: kleine, dicht gepackte Axonbündel, welche die drei HCN-Isoformen vergleichbar stark exprimieren und große Axonbündel, in denen hauptsächlich HCN4 exprimiert wird. Die Isoform HCN3 wird nicht im olfaktorischen Epithel der Maus exprimiert.

Durch spezifische shRNA-Moleküle können z. B. HCN-Gene posttranskriptional herabreguliert werden. Es wurden rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) hergestellt, die den Gentransfer der shRNA-kodierenden Sequenzen ermöglichen. In transgenen Zelllinien, die HCN-Isoformen konstitutiv exprimierten, konnte für HCN1 und HCN2 eine signifikante Herabregulation der Genexpression nach der Infektion mit rAAV_shRNA-Konstrukten nachgewiesen werden. Insbesondere für HCN2 war die *de novo* Proteinbiosynthese nahezu vollständig inhibiert.

Schließlich wurde die Transduktionsfähigkeit von ORN mit rAAV *in vivo* anhand rAAV-vermittelter eGFP-Expression untersucht. Sowohl ORN als auch Stützzellen werden durch rAAV des Serotyps 2 und 5 transduziert. In transduzierten Zellen war die eGFP-Expression sehr stark und ermöglichte eine eindeutige Identifizierung der Zelltypen aufgrund ihrer Morphologie. Der viral-vermittelte Gentransfer kann nun in weiterführenden Experimenten genutzt werden um sowohl Gene in lebende Tiere einzubringen als auch die Expression bestimmter Gene spezifisch herabzuregulieren, um die funktionelle Bedeutung der kodierten Proteine *in vivo* zu untersuchen.

Abstract

HCN channels (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels) are membrane proteins participating in the generation of spontaneous rhythmic electrical activity in cellular networks. Therefore these channels are called pacemaker channels. This thesis describes for the first time, the expression pattern of four different HCN channel isoforms (HCN1 - HCN4) in the olfactory epithelium of the mouse on a subcellular level.

The isoforms HCN1 and HCN2 are expressed in olfactory receptor neurons (ORN), more specifically in the dendrites and axons of the ORN. Strong labeling was particularly seen in the axon bundles. The HCN4 isoform was found almost exclusively in the axons of the ORN. Furthermore, the immunohistochemical stainings allowed to distinguish between two morphologically different axon bundles: small, tightly-packed axon bundles which express HCN 1, 2 and 4 to similar degrees, and large axon bundles in which predominantly HCN4 is expressed. Notably, HCN3 seems not to be expressed in the olfactory epithelium of the mouse.

Specific shRNA molecules can be utilized to achieve a post-transcriptional downregulation of genes. To this end, recombinant adeno-associated viruses (rAAV) were constructed allowing the gene transfer of shRNA-coding sequences. In transgenic cell lines which constitutively expressed specific HCN isoforms, a significant downregulation of HCN1 and HCN2 gene expression was achieved after infections with rAAV_shRNA constructs. Especially for HCN2, *de novo* protein biosynthesis was impaired almost completely.

In a series of experiments, the transduction capability of rAAV for ORN was examined *in vivo* by virus-mediated eGFP expression. Both, ORN and supporting cells were successfully transduced by rAAV of serotype 2 and 5. In transduced cells, eGFP expression was very high and allowed to unequivocally identify the different cell types by their morphology.

In summary, this thesis demonstrates that rAAV-mediated gene transfer is a versatile method that can be used both, to introduce genes into living organisms as well as to specifically knock down gene expression by rAAV_shRNA thereby supporting the ultimate goal to study a proteins' function *in vivo*. As likely candidates, individual HCN isoforms might now be targeted as their subcellular expression pattern has been unraveled in the olfactory epithelium of the mouse.