

## Zusammenfassung

HCN (*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated*) Kanäle können die spontane rhythmische Aktivität zellulärer Netzwerke modulieren. In dieser Arbeit wurden die Expressionsmuster einzelner HCN-Isoformen in immortalisierten Kardiomyozyten (HL-1 Zellen), primären Neuronen und nativem hippocampalem Gewebe sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene untersucht. HL-1 Zellen teilen Eigenschaften nativer Kardiomyozyten, wie z.B. spontane Kontraktilität, und entwickeln während der Kultivierung verschiedene Morphologien. Auf molekularer Ebene beobachtet man unterschiedliche Expressionsmuster von HCN-Kanälen in Abhängigkeit von der Zelldichte. Mögliche Korrelationen zwischen der HCN-Isoform Expression und der HL-1 Differenzierung wurden in dieser Arbeit untersucht. In verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems wurden unterschiedliche Expressionsmuster von HCN1, HCN2 und HCN4 nachgewiesen. Die Expressionslevel von HCN1 und HCN2 waren signifikant höher als die von HCN4. HCN3 war kaum zu detektieren. Im Hippocampus wurden HCN1 und HCN4 in synaptischen Kontakten an Somata von Pyramidalzellen identifiziert, wohingegen HCN2 in Interneuronen des gesamten Hippocampus detektiert wurde. HCN1 und HCN2 bilden einen Gradienten ansteigender Expressionsdichte entlang der Dendriten von CA1 Pyramidalzellen. In dieser Arbeit konnte ein solcher Expressionsgradient erstmalig auch für HCN4 gezeigt werden.

Gewebefunktionen werden während der Entwicklung durch die spezifische Expression von Proteinen in funktionell spezialisierten Gewebeabschnitten bestimmt. Die posttranskriptionale Herabregulation von HCN-Genen kann durch das Einbringen spezifischer shRNA-Konstrukte induziert werden. Rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) wurden als 'Genfähren' für den *in vivo* Transfer von shRNA-kodierenden Konstrukten verwendet. Dieser Ansatz wurde *in vitro* an stabilen, HCN-Isoform exprimierenden Zelllinien, an zellulären Modellsystemen, sowie an HCN-Kanal exprimierenden Geweben etabliert. Ein spezifischer und effizienter Knockdown von HCN1, HCN2 und HCN4 konnte nach Einbringen von shRNA-kodierenden rAAV-Konstrukten nachgewiesen werden.

Der Hippocampus wurde für die *in vivo* Anwendung des rAAV-vermittelten Knockdowns der HCN4-Isoform gewählt. Die Herabregulation von HCN4 *in vivo* wurde quantifiziert und der Effekt der veränderten HCN4 Expression auf das Lernverhalten adulter Mäuse untersucht. Der HCN4 Knockdown hatte einen schwachen anxiogenen Effekt und unterstützte die Angstkonditionierung signifikant. Diese Vorgehensweise kann nun in weiterführenden

Experimenten zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung einzelner HCN-Isoformen im Lernverhalten von Mäusen genutzt werden.

## Abstract

Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated (HCN) channels can modulate spontaneous rhythmic activity in cellular networks. In this thesis, the transcript and protein expression patterns of HCN isoforms were resolved in immortalized cardiomyocytes (*i.e.* HL.1 cells), primary neurons, as well as in native hippocampal tissue. Immortalized cardiomyocytes mimic properties of native cardiomyocytes and acquire strikingly different morphologies in culture that are reflected on the molecular level by surprisingly diverse expression patterns of HCN channels. Potential correlations between HCN isoform expression and HL-1 cell differentiation were examined. In the CNS, distinct expression patterns of HCN1, HCN2, and HCN4 were observed in various areas including the hippocampal formation. HCN1 and HCN2 expression levels were significantly higher than that of HCN4, while HCN3 was barely detected. In the hippocampal formation, HCN1 and HCN4 are expressed in synaptic contacts at somata of pyramidal neurons, whereas HCN2 is expressed in interneurons throughout the hippocampus. HCN1 and HCN2 are expressed in a gradient of increasing density along the dendrites of CA1 pyramidal cells and, for the first time, a similar expression gradient could be shown for HCN4 in this thesis.

Tissue function is determined by developmentally specified expression of proteins in distinct, functionally specialized tissue segments. Posttranscriptional silencing of HCN genes can be induced using specific shRNA constructs. Recombinant adeno-associated viruses (rAAV) were used as vehicles for *in vivo* transfer of shRNA-encoding constructs. This approach was established *in vitro* on cell lines constitutively expressing individual HCN isoforms as well as on cellular ‘model’ systems of HCN channel-expressing tissues. Specific and efficient knockdown of HCN1, HCN2, and HCN4 could be shown after application of shRNA-encoding rAAV constructs.

The hippocampal formation was chosen as an *in vivo* target for rAAV-mediated knockdown of the HCN4 isoform. HCN4 downregulation *in vivo* was confirmed and the effect of altered HCN4 expression on learning behavior was investigated. Downregulation of HCN4 led to slightly increased anxiety-related behavior and significantly promoted fear memory in mice. This approach can be used in future experiments to further dissect the functional contribution of individual HCN isoforms to different learning behaviors.