

# Abstract

Energy uptake and expenditure need to be tightly regulated, otherwise overweight and obesity can develop. This regulation is mainly performed by the melanocortin system, which is located in the arcuate nucleus of the hypothalamus. However, in its role as an energy source, food also acts as a potent natural reward. Hence, the homeostatic regulation by the melanocortin system can be overridden by the reward system. Thereby, food intake can be elicited, although the energy demand of the organism is already covered. Midbrain dopaminergic neurons build an integral part of the reward system and were already shown to be acutely modulated by feeding peptides like insulin and leptin. In the present thesis, the effect of a prolonged, high caloric food intake on midbrain dopaminergic neurons of the substantia nigra was investigated. Male mice were after weaning fed with a high-fat diet for 10-13 weeks to induce obesity. Following this dietary intervention, perforated patch recordings were performed on acute brain slices of the substantia nigra. It could be found that the autonomous pacemaker activity, which is characteristic for midbrain dopaminergic neurons, was in some neurons disturbed. Compared to lean mice, the number of neurons with disturbed pacemaker activity was in obese mice increased by 31 %. The disturbances persisted, if the recorded neuron was pharmacologically isolated from synaptic input, indicating that an intrinsic mechanism led to their development.

Measurements using the 'added buffer' approach revealed that in dopaminergic neurons of obese mice the calcium buffering capacity and clearance rate were compared to lean mice decreased. However, the resting calcium levels were unaltered, suggesting that a compensatory reduction of the calcium influx had occurred. In dopaminergic neurons of lean mice, a reduction of the calcium influx by application of 40  $\mu\text{M}$  cadmium evoked disturbances in the pacemaker activity. Furthermore, a simultaneous reduction

of the hyperpolarization-activated cation current enabled to already induce disturbances by application of 20  $\mu\text{M}$  cadmium. A single reduction of the hyperpolarization-activated cation current did however not affect pacemaker activity. Therefore, the hyperpolarization-activated cation current was considered to stabilize the pacemaker activity in substantia nigra dopaminergic neurons. Both, the stabilizing role of the hyperpolarization-activated cation current, as well as the requirement for precise calcium handling in the generation of regular pacemaker activity, could be confirmed in a computational model. Taken together, this thesis provide new insights into the generation of pacemaker activity in dopaminergic neurons, as well as on its metabolic modulation in obesity. The disturbances in pacemaker activity, which were predominately found in neurons of obese mice, could *in vivo* result in a decreased dopamine tone in the target area of the dopaminergic neurons and thereby promote reward deficiency.

# Zusammenfassung

Essverhalten und Energieverbrauch eines Organismus müssen genau aufeinander abgestimmt sein, da sonst Übergewicht und Adipositas entstehen können. Diese Abstimmung wird hauptsächlich durch das Melanocortin System im Arcuate Nucleus des Hypothalamus gewährleistet. Da Nahrung als zentraler Energieträger jedoch eine starke Belohnung repräsentiert, können Signale des Melanocortin-Systems durch das Belohnungssystem überschrieben werden. Dadurch kann Essverhalten auch dann ausgelöst werden, wenn der Energiebedarf des Körpers bereits gedeckt ist. Dopaminerge Nervenzellen des Mittelhirn bilden einen wesentlichen Bestandteil des Belohnungssystems und ihre Aktivität kann durch Signale aus der Peripherie, die im Zusammenhang mit dem Nahrungsstatus des Körper stehen, moduliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer langanhaltenden, hoch-kalorischen Ernährung auf die Aktivität dieser dopaminergen Nervenzellen untersucht. Dazu wurden männliche Mäuse nach dem Absetzen von der Mutter für 10-13 Wochen mit hoch-fetthaltigem Futter gefüttert um Adipositas hervorzurufen. Anschließend wurden in akuten Hirnschnitten der Substantia nigra die elektrophysiologischen Eigenschaften der dopaminergen Nervenzellen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass in einem Teil der dopaminergen Nervenzelle die charakteristische, autonome Schrittmacher Aktivität („pacemaker activity“) durch Pausen unterbrochen war. Der Anteil dieser dopaminergen Nervenzellen mit unterbrochener Schrittmacher Aktivität stieg in adipösen Mäusen um 31 % an.

Da die Unterbrechungen in der Schrittmacher Aktivität fortbestanden wenn die abgeleitete Nervenzelle pharmakologisch von synaptischen Eingängen isoliert wurde, ist darauf zu schließen, dass den Unterbrechungen ein intrinsischer Mechanismus zugrunde liegt. Mit Hilfe des ‚added buffer‘ Konzepts konnte gezeigt werden, dass dopamin-

erge Nervenzellen von adipösen Mäusen eine verringerte Kalzium Pufferkapazität und Extrusion aufwiesen. Jedoch war die intrazelluläre Kalzium Ruhe-Konzentration unverändert was darauf hindeutet, dass die reduzierte Kalzium Pufferkapazität und Extrusion mit einer kompensatorische Reduzierung des Kalzium Einstroms einhergingen. In dopaminergen Nervenzellen normalgewichtiger Mäuse führte eine Reduzierung des Kalzium Einstroms durch Applikation von  $40 \mu\text{M}$  Cadmium zu Unterbrechungen in der Schrittmacher Aktivität. Mit einer zusätzlichen Reduzierung des Hyperpolarisations-aktivierten Kationenstroms konnten Unterbrechungen bereits mit einer Applikation von  $20 \mu\text{M}$  Cadmium ausgelöst werden. Eine einzelne Reduzierung des Hyperpolarisations-aktivierten Kationenstrom ließ die Schrittmacher Aktivität jedoch unbeeinflusst. Demnach scheint der Hyperpolarisations-aktivierte Kationenstrom die Schrittmacher Aktivität dopaminergen Nervenzellen zu stabilisieren. Die stabilisierende Rolle des Hyperpolarisations-aktivierten Kationenstroms, sowie die maßgebliche Rolle der präzisen Kalzium Regulation in der Aufrechterhaltung von Schrittmacher Aktivität, konnte in einem Computermodell einer dopaminergen Nervenzellen bestätigt werden.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit neue Erkenntnisse über die Generierung von Schrittmacher Aktivität in dopaminergen Nervenzellen und über ihre Modulation durch Adipositas. Die in Nervenzellen von adipösen Tieren vermehrt auftretenden Unterbrechungen in der Schrittmacher Aktivität führen *in vivo* wahrscheinlich zu einem verminderten Dopamin-Level in den Zielgebieten dopaminergen Nervenzellen und fördern dadurch die Entstehung eines Belohnungsdefizits.