



Doctoral Thesis

Neurochemical mechanisms mediating LPS-induced anorexia

Author(s):

Kopf, Brigitte Sandra

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005901956> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 18407

Neurochemical mechanisms mediating LPS-induced anorexia

A dissertation submitted to the

ETH ZURICH

For the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

Presented by

Brigitte Sandra Kopf

M.Sc. (Institute of Zoology, University Zurich, Switzerland)

Born on April 6st, 1976,

From Germany

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner

Prof. Dr. Nori Geary, co-examiner

Prof. Dr. Alessandro Laviano, co-examiner

2009

1 Summary

Anorexia is a prominent component of the innate immune response during bacterial infections or other immune challenges. Over the last years substantial progress has been made in identifying the contributions of several peripheral components of the immune reaction to illness anorexia. However, neither how these peripheral events communicate with the brain nor which central neural mechanisms they activate to produce illness anorexia is clear. Several lines of evidence suggest that illness anorexia arises from altered neural processing within the same networks that mediate normal eating. For example, prostaglandin E₂ (PGE₂), brain serotonin (5-HT) and catecholamines (CA) all seem to play an important role in both normal eating and illness anorexia. A common experimental model of anorexia following gram-negative bacterial infection is bacterial lipopolysaccharide (LPS) administration. This thesis addresses the possible neurochemical mechanisms of LPS anorexia. We wanted to identify brain sites involved in the initial phase of LPS anorexia, which might also be necessary for the subsequent phases, and to identify possible neurotransmitters or receptors involved. Brain areas that have been implicated in the control of normal eating are the paraventricular nucleus (PVN), arcuate nucleus (Arc) and the central nucleus of the amygdala (CeA) in the forebrain, the hindbrain areas nucleus tractus solitarius (NTS), A1 area of noradrenergic ventrolateral medulla (A1), area postrema (AP) and the raphe nuclei such as the midbrain dorsal and median raphe nuclei (DR and MnR) and the hindbrain raphe pallidus nucleus (RPa) and raphe magnus nucleus (RMg).

In the first study, we further investigated the role of the 5-HT_{2C} receptor (2CR) in LPS anorexia. Anatomically, we focused on the PVN, Arc and CeA because these areas receive 5-HT projections from the midbrain raphe. In particular, ascending 5-HT fibers contact hypothalamic neuropeptide Y and pro-

opiomelanocortin neurons via 5-HT_{1B} receptors (5-HT_{1B}R) or 2CR and could therefore be the morphological substrate mediating the effect of 5-HT on eating.

In Experiment 1, we intraperitoneally (ip) injected male Long Evans rats with the potent and selective 2CR antagonist SB 242084 or vehicle 1 h before dark onset and with LPS or vehicle at dark onset, and we measured the effects on food intake for 23 h. Because our goal was to identify sites involved in the initial phase of LPS anorexia, we treated another group of rats identically, but sacrificed them and measured expression of c-Fos protein 90 min after LPS injection. c-Fos protein was measured immunocytochemically, and the numbers of neurons expressing c-Fos was counted in all brain areas mentioned above. LPS alone reduced the nocturnal food intake starting 2 hours after ip injection and it increased the number of c-Fos expressing cells in all brain areas examined. Pretreatment with SB 242084 completely reversed LPS anorexia and, most relevant to our hypothesis that 5-HT connections from the midbrain raphe to the hypothalamus are crucial for LPS anorexia, pretreatment with SB 242084 completely reversed the LPS-induced increases in c-Fos expression in the PVN and CeA and tended to do so in the Arc. Besides that SB 242084 also reversed LPS-induced c-Fos increases in the DR, MnR, RPa, NTS and A1 and tended to do so in the RMg.

These findings indicate that 5-HT signaling via 2CR is necessary for LPS anorexia under our conditions and for much of LPS-induced neuronal activation. Because the reversal of LPS-induced c-Fos by SB 242084 was widespread, however, we could not identify a single likely pathway for the mediation of LPS anorexia.

As previous studies also implicated PGE₂ in LPS anorexia [1, 2] we performed a second series of studies to better understand the role of PGE₂ in LPS anorexia and especially to identify the brain areas where it may act to elicit LPS anorexia. The cyclooxygenase-2 (COX-2) antagonist NS-398 or vehicle was administered ip to rats 1 h before dark onset and 1 h later they were injected ip with LPS or vehicle. We examined first the effects on food intake within the first 23 hours and mapped brain regions in which PGE₂ was necessary for neuronal

activation, indicated again by c-Fos immunocytochemistry measured 90 min after ip LPS. Second, we investigated whether PGE₂ action in the midbrain raphe nuclei plays a role in LPS anorexia. In one set of rats, PGE₂ was microinjected directly into the DR and the effect on food intake was measured. In another set of rats, food intake in response to LPS was measured after NS-398 administration in the DR and MnR.

Pretreatment with NS-398 completely reversed LPS anorexia, suggesting that reduction of PGE₂ synthesis blocked LPS anorexia under our conditions, and reduced or eliminated LPS-induced c-Fos expression in several brain areas, indicating that PGE₂ is necessary for some or all LPS-induced neural activation. Intracranial injections of PGE₂ into the DR reduced food intake whereas intracranial injections of NS-398 into the DR and MnR reduced LPS anorexia. Therefore, the action of PGE₂ in the midbrain raphe might be required for ip LPS anorexia.

In the last study we investigated whether a graded anorectic effect of LPS could be observed using two different doses of ip LPS, and whether such a graded anorectic effect would be associated with a graded neural activation. Since our previous studies indicated the midbrain raphe to play an important role in LPS anorexia and given that this area is rich in 5-HT neurons we also performed a co-localization study of c-Fos and tryptophan-hydroxylase (TPH), a marker of 5-HT-ergic neurons in the DR, MnR and RPa. Additionally the NTS and ventrolateral medulla innervate the PVN with CA projections which are predominantly involved in the immune-responsive input to the PVN. Therefore, in this last study we also analyzed the co-localization of c-Fos and tyrosine-hydroxylase (TH), a marker of CA neurons, in the A1, PVN and NTS.

We observed a dose-related reduction in food intake in the initial 1-2 h after injection which was also associated with a dose-related increase in neural activation in the DR, PVN and Arc. Both doses significantly increased the c-Fos expression in the other brain areas examined, but these effects were not dose-related. These findings suggest that the graded LPS-induced anorectic effect is associated with a dose-related increase in neural activation in the DR, PVN and

Arc. We also observed significant increases in c-Fos expression in the DR, MnR and RPa neurons that were TPH-expressing neurons. Finally, the increased activation in the A1 by both doses of LPS may be CA-mediated because the c-Fos expression was significantly co-localized with TH positive neurons in this area, but not in the NTS or PVN.

In summary these findings support the hypothesis that several brain areas such as the midbrain raphe, PVN, CeA and Arc are involved in the initial phase of LPS anorexia and that 5-HT, PGE₂ and CA play a necessary role in LPS anorexia.

2 Zusammenfassung

Anorexie ist ein wichtiger Bestandteil der Reaktion des angeborenen Immunsystems während bakteriellen Infektionen oder bei anderen Herausforderungen des Immunsystems. In den letzten Jahren wurden wesentliche Fortschritte bei der Identifizierung der verschiedenen peripheren Komponenten des Immunsystems identifiziert, die zur Entstehung von Anorexie führen. Weitgehend unklar ist jedoch, wie periphere Signale mit dem Gehirn kommunizieren und welche zentralen Mechanismen sie aktivieren, um Anorexie auszulösen. Erkenntnisse aus unterschiedlichen Studien lassen vermuten, dass Anorexie bei Krankheit durch Aktivitätsveränderungen im gleichen neuronalen Netzwerk im Gehirn entsteht, welches normalerweise die Nahrungsaufnahme steuert.

Zum Beispiel scheinen Prostaglandin-E₂ (PGE₂), Serotonin (5-HT), aber auch Katecholamine (CA) bei der normalen Steuerung der Nahrungsaufnahme, wie auch bei der Anorexie, eine wichtige Rolle zu spielen. Ein bekanntes experimentelles Model zur Untersuchung der bakteriell induzierten Anorexie ist die Verabreichung von Lipopolysacchariden (LPS).

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit den möglichen neurochemischen Mechanismen der durch LPS induzierten Anorexie. Ziel war es, insbesondere diejenigen Hirnregionen zu identifizieren, welche in der Anfangsphase der LPS-induzierten Anorexie eine entscheidende Rolle spielen, sowie herauszufinden, welche Neurotransmitter und Rezeptoren involviert sein könnten. Hirnregionen, welche in die Steuerung der normalen Nahrungsaufnahme involviert sind, sind im Vorderhirn der hypothalamische Nucleus paraventricularis (PVN), der Nucleus arcuatus (Arc) und die zentralen Bereiche der Amygdala (CeA). Im Hinterhirn sind es unter anderem der Nucleus tractus solitarii (NTS), die A1-Region der noradrenergen, ventrolateralen Medulla (A1), die Area postrema (AP) und die Raphe-Kerne wie zum Beispiel im Mittelhirn der dorsale und mittlere Raphe-Kern (DR und MnR) sowie im Hinterhirn der Raphe pallidus-Kern (RPa) und der Raphe magnus-Kern (RMg).

In der ersten Studie untersuchten wir die Rolle der 5-HT-2C Rezeptoren (2CR) bei der LPS-Anorexie. Anatomisch konzentrierten wir uns dabei auf den PVN, den Arc und die CeA, da diese Hirnregionen von 5-HT-Fasern aus der Mittelhirnregion innerviert werden. Im Besonderen innervieren diese 5-HT-Fasern die hypothalamischen Neuropeptid Y- und Pro-opiomelanokortin-Neurone über 5-HT_{1B} Rezeptoren (5-HT_{1B}R) oder 2CR. Diese Verbindungen könnten daher das morphologische Substrat sein, welches die Wirkung von 5-HT auf die Nahrungsaufnahme vermittelt.

Im ersten Experiment erhielten Long Evans-Ratten vor Beginn der Dunkelphase eine intraperitoneale (ip) Injektion des potenten 2CR-Antagonisten SB 242084 oder eine Kontrollinjektion. Zu Beginn der Dunkelphase erhielten sie eine zweite ip Injektion von LPS oder Kontrolllösung. Daraufhin wurde die Nahrungsaufnahme für 23 Stunden gemessen. Unser Ziel war es, Hirnregionen zu identifizieren, welche bei der durch LPS induzierten Anorexie eine entscheidende Rolle spielen. Daher wurde eine zweite Gruppe von Long Evans-Ratten identisch behandelt wie die erste Gruppe, mit dem Unterschied, dass diese Tiere 90 Minuten nach der LPS-Injektion getötet wurden, um die Expression des c-Fos-Proteins in den jeweiligen Hirnregionen zu messen. Das c-Fos Protein wurde immunozytologisch gemessen und die Anzahl der Neurone, die c-Fos exprimieren, wurde in den oben erwähnten Hirnregionen gezählt. LPS reduzierte die Futteraufnahme innerhalb der ersten 2 Stunden der Dunkelphase und erhöhte die Anzahl der c-Fos exprimierenden Neurone in allen untersuchten Hirnregionen. Die Vorbehandlung mit SB 242084 verhinderte die LPS-induzierte Anorexie vollständig. Im Einklang mit unserer Hypothese, dass 5-HT-Verbindungen vom Mittelhirn zum Hypothalamus für die LPS-induzierte Anorexie eine entscheidende Rolle spielen, führte die Vorbehandlung mit SB 242084 zu einer völligen Blockade der LPS-induzierten c-Fos-Expression innerhalb des PVN und des CeA. Derselbe Trend wurde auch im Arc beobachtet. Zudem reduzierte SB 242084 auch die LPS-induzierte c-Fos-Expression in DR, MnR, RPa, NTS und A1. Im RMg war der Trend ebenfalls vorhanden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass 5-HT, welches via 2CR Signale weiterleitet, unter unseren Bedingungen bei der durch LPS induzierten neuronalen Aktivierung notwendig ist. Da aber die Reduktion der LPS-induzierten neuronalen Aktivität durch SB 242084 nicht auf einzelne Hirnregionen beschränkt war, können wir aus unseren Ergebnissen nicht auf einen spezifischen Signalisationsweg schliessen.

Früheren Studien zufolge spielt auch PGE_2 eine wichtige Rolle bei der durch LPS induzierten Anorexie. Deswegen führten wir eine zweite Studie durch, um die Rolle von PGE_2 bei der LPS-induzierten Anorexie besser zu verstehen und ebenfalls insbesondere die dabei involvierten Hirnregionen zu identifizieren. Eine Stunde vor Beginn der Dunkelphase wurde einer Gruppe von Ratten der Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Antagonist NS-398 oder entsprechende Kontrolllösung ip injiziert. Zu Beginn der Dunkelphase erhielten die Ratten eine zweite ip Injektion von LPS oder Kontrolllösung. Zuerst wurde der Effekt dieser Behandlungen auf die Nahrungsaufnahme innerhalb der ersten 23 Stunden gemessen; danach wurde wie bereits oben erwähnt 90 Minuten nach der 2. Injektion die neuronale Aktivität innerhalb der spezifischen Hirnregionen gemessen. Des Weiteren untersuchen wir, ob PGE_2 in den Raphe-Kernen des Mittelhirns für die LPS-Anorexie eine Rolle spielt. Daher wurde bei einer weiteren Gruppe von Ratten der Effekt einer Mikroinjektion von PGE_2 in den DR auf die Nahrungsaufnahme untersucht. Eine zusätzliche Gruppe von Ratten erhielt schliesslich eine Mikroinjektion von NS-398 in den DR und MnR und der Effekt von LPS auf die Nahrungsaufnahme wurde ebenfalls untersucht.

Die Vorbehandlung mit NS-398 führte zu einer kompletten Blockierung der LPS-induzierten Anorexie. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die PGE_2 -Synthese für die LPS-Anorexie unter unseren Bedingungen unabdingbar ist. Des Weiteren führte NS-398 zu einer totalen Eliminierung oder zumindest zu einer Reduktion der durch LPS induzierten c-Fos-Expression in mehreren Hirnregionen. Nach diesen Resultaten ist PGE_2 für die durch LPS ausgelöste neurale Aktivierung notwendig oder zumindest daran beteiligt. Die direkte Injektion von PGE_2 in den DR führte zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und die Injektion von NS-

398 in den DR und MnR zu einer Reduktion der LPS-induzierten Anorexie. Dies weist darauf hin, dass PGE₂ an der Induktion der durch ip LPS ausgelösten Anorexie in den Raphekernen des Mittelhirns beteiligt ist.

In der letzten Studie wurde untersucht, ob zwei verschiedene ip verabreichte Dosen von LPS (12.5 und 100 µg/kg) auch zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten anorektischen Effekt führen und ob ein derartiger Unterschied gegebenenfalls auch in einer unterschiedlichen neuronalen Aktivierung zu sehen ist. Unsere vorhergehenden Studien liessen eine wichtige Rolle der Raphekerne des Mittelhirns für die LPS-Anorexie vermuten. Diese Hirnregion ist reich an 5-HT-Neuronen. Daher führten wir in den Raphe-Regionen DR, MnR und RPa auch eine Kolokalisationsstudie mit c-Fos und Tryptophanhydroxylase (TPH) durch. Letzteres ist ein Indikator für 5-HT-Neurone, Zudem zeigten frühere Studien, dass der NTS und die ventrolaterale Medulla den PVN mit CA-Fasern innervieren und dass diese CA-Projektionen überwiegend in die Weiterleitung von Immunsignalen an den PVN involviert sind. Deswegen wurde innerhalb des A1, NTS und PVN eine weitere Kolokalisationsstudie mit c-Fos und Tyrosine-Hydroxylase (TH) durchgeführt, einem Indikator für CA-Neurone.

Wir beobachteten eine von der LPS-Dosis abhängige Reduktion der Nahrungsaufnahme innerhalb der ersten 1-2 Stunden nach der Injektion. Diese dosisabhängige Verzehrsreduktion ging mit einer dosisabhängigen neuronalen Aktivierung innerhalb des DR, PVN und Arc einher. Beide LPS-Dosierungen erhöhten die c-Fos-Expression auch in allen anderen untersuchten Hirnregionen, aber diese Effekte waren nicht dosisabhängig. Diese Befunde weisen darauf hin, dass der dosisabhängige verzehrsreduzierende Effekt von LPS mit einer gleichzeitigen dosisabhängigen neuronalen Aktivierung in den Hirnregionen DR, PVN und Arc einhergeht. Wir beobachteten auch eine Zunahme der c-Fos Expression innerhalb der TPH-positivrn Neurone des DR, MnR und RPa.

Die Kolokalisationsstudie mit c-Fos und TH zeigte, dass die erhöhte neuronale Aktivierung innerhalb der A1-Region durch beide LPS Dosierungen CA-Neurone betrifft, denn die c-Fos exprimierenden Neurone waren auch TH-positiv. Im NTS oder PVN wurde jedoch keine Kolokalisation zwischen c-Fos und TH gefunden.

Insgesamt unterstützen diese Resultate die Vermutung, dass unterschiedliche Hirnareale wie die Raphe-Kerne des Mittelhirns, PVN, CeA und Arc in die initiale Phase der LPS-Anorexie involviert sind und dass 5-HT, PGE₂ sowie CA bei der LPS-Anorexie eine wichtige Rolle spielen.