

DISS. ETH Nr. 18686

# GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1) AND SATIATION

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER WISSENSCHAFTEN

der  
ETH ZÜRICH

vorgelegt von

Elisabeth Barbara Rüttimann

Dipl. Biologie II, Universität Basel

geboren am

27.Juli.1977

von

Abtwil (AG)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Wolfgang Langhans

Prof. Steven C. Woods

Prof. Nori Geary

Prof. Bruce McDonald

2010

)

# 1 Summary

Signaling molecules that are released from several peripheral tissues, including the gastrointestinal tract, the pancreas and the adipose tissue, in response to a variety of physiological stimuli are involved in the control of food intake. One of these is glucagon-like peptide-1 (GLP-1), which is released by intestinal L-cells in response to preabsorptive nutrient stimuli. GLP-1 is rapidly degraded in the plasma by dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV), so that a steep concentration gradient exists, with highest concentrations in the lamina propria of the intestinal mucosa, intermediate levels in the hepatic portal vein (HPV), and lowest levels in the systemic circulation. GLP-1's most extensively examined function is its incretin effect, i.e., the regulation of postprandial glucose metabolism via the stimulation of insulin secretion. Increasing evidence suggests that GLP-1 is also involved in the control of eating. At present, however, both the site of the GLP-1 receptors (GLP-1R) influencing eating and the physiological relevance of endogenous intestinal GLP-1 for eating are not clear. Moreover the pattern and magnitude of GLP-1 release in response to meals in rats are not known. These three questions are addressed in this thesis.

In the first set of experiments we investigated the site of action of peripheral GLP-1's eating-inhibitory effect and the role of vagal afferent signaling in it. Because it has been demonstrated that vagal afferents terminating in the hepatic region are necessary for the full effect of GLP-1 on insulin secretion, we hypothesized that GLP-1's eating-inhibitory effect might also depend on GLP-1R in the hepatic portal vein (HPV) or liver. We tested this hypothesis, first, by comparing the potencies of HPV and vena caval (VC) infusions of GLP-1 to inhibit spontaneous eating in rats, and, second, by comparing the effects of intraperitoneal (IP) and HPV infusions of GLP-1 on eating in neurally intact rats and rats with selective subdiaphragmatic vagal deafferentations. In the second set of experiments we addressed the physiological relevance of GLP-1 in the control of spontaneous eating. To this end, we intraperitoneally infused the GLP-1R antagonist exendin (9-39) [Ex (9-39)] during meals. In the third set of experiments we measured the effect of mixed-nutrient meals and HPV infusions of GLP-1 on the levels of the active form of GLP-1 in the HPV and VC.

## Summary

Vehicle, 0.3, 1 and 3 nmol/kg body weight (BW) GLP-1 was infused into the HPV. One and 3 nmol/kg GLP-1 potentially decreased ongoing meal size, but did not significantly affect cumulative food intake or later meals. When 1 nmol/kg BW GLP-1 was infused into either VC or HPV in rats prepared with double catheters, meal size was reduced similarly by the two infusions, suggesting that the eating-inhibitory effect of GLP-1 does not depend on GLP-1R in the HPV or liver. Next, we compared the effects of HPV infusions of Veh, 0.25, 0.5 and 1 nmol/kg GLP-1 on spontaneous eating in subdiaphragmatically deafferentated (SDA) and sham operated (Sham) rats. No differences were detected between the groups. Finally, we compared the effects of HPV or IP infusions of 10 nmol GLP-1 in the two surgical groups. HPV infusions of GLP-1 again reduced ongoing meal size significantly in SDA rats, but identical IP GLP-1 infusions had no significant effect in SDA rats. This suggests that IP, but not HPV, GLP-1 may act on GLP-1R in the lamina propria of the intestinal mucosa to initiate a vagal afferent signal, whereas HPV GLP-1 may act directly in the brain to inhibit eating.

In the second set of experiments, rats with IP catheters were used. First we tested Veh, 2.5, 5 and 10 nmol/kg GLP-1. Only 10 nmol/kg reduced ongoing meal size; both 5 and 10 nmol/kg reduced ongoing meal duration. In the next experiments we tested IP infusions of Ex (9-39) during the second spontaneous nocturnal meal, similar to a situation in which others reported that Ex (9-39) increased eating. Neither 10 nor 30 nmol/kg Ex (9-39) reliably stimulated eating in our tests, however. As a positive control, we IP infused 10 nmol/kg GLP-1 alone or together with 30 nmol/kg Ex (9-39), and observed that Ex (9-39) significantly blocked the satiating effect of GLP-1. Thus, IP Ex (9-39) reaches the receptors mediating the satiating action of exogenous GLP-1, but is not able to antagonize any action of endogenous GLP-1. These findings suggest that endogenous GLP-1 is not relevant for satiation under our test conditions.

In the final set of experiments we investigated the effect of ingestion of a 3 g mixed-nutrient meal after 5 h food deprivation on active GLP-1, glucose and insulin levels sampled simultaneously from HPV and VC catheters. HPV GLP-1 levels were significantly increased at 6 and 15 min after meal onset. In contrast, VC GLP-1 levels were not significantly increased at any time. Glucose and insulin levels increased more in the HPV than in VC and remained elevated throughout the 25 min test. Last,

## Summary

HPV infusion of 1nmol/ kg BW GLP-1 was done after 3 h food deprivation, with food withheld during the test, and VC blood samples were taken. HPV GLP-1 infusion increased VC GLP-1 levels more than did the meal. Insulin levels peaked at 6 min, and glucose levels were decreased 6 and 10 min after GLP-1 infusion. These results demonstrate that nutrients rapidly elicit intestinal GLP-1 release and that GLP-1 action on insulin is limited at basal glucose values. Thus, GLP-1 is released at a time that is relevant for satiation. In addition, that HPV GLP-1 infusion increased VC GLP-1 levels is consistent with the possibility that HPV GLP-1 acts in the brain to inhibit eating.

In summary we found that HPV, VC and IP GLP-1 infusion during spontaneous meals in rats reduce ongoing meal size, consistent with a role of GLP-1 in satiation. Intravenous GLP-1 infusions may have acted on GLP-1R in the brain to inhibit eating, whereas IP GLP-1 seems to have activated receptors on vagal afferents terminating in the lamina propria of the intestinal mucosa, near the site of release of endogenous intestinal GLP-1. Finally, although GLP-1 is released rapidly after meal onset, in time to participate in satiation, we were not able to obtain evidence for a satiating action of endogenous GLP-1 using GLP-1R antagonism. The mechanisms and physiological relevance of intestinal GLP-1 in satiation during spontaneous meals in rats require further investigation.

## 2. Zusammenfassung

Signalmoleküle, die von verschiedenen peripheren Geweben, einschliesslich Magendarmtrakt, Pankreas und Fettgewebe, als Reaktion auf eine Vielzahl von physiologischen Reizen freigesetzt werden, sind in die Steuerung der Nahrungsaufnahme involviert. Ein solches Signalmolekül ist das Hormon Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1), das von L-Zellen im Darm als Reaktion auf präabsorptive Nährstoffreize freigesetzt wird. GLP-1 wird im Plasma durch Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) rasch inaktiviert, so dass ein steiles Konzentrationsgefälle existiert: Die höchsten Konzentrationen findet man in der Lamina Propria der intestinalen Mukosa, mittlere Konzentrationen in der hepatischen Pfortader (HPV), und die tiefsten in der systemischen Zirkulation. Die am besten untersuchte Funktion von GLP-1 ist sein Inkretin-Effekt, d.h. die Regulation des postprandialen Glucose-Metabolismus durch die Stimulation der Insulinfreisetzung. Mehr und mehr Hinweise sprechen aber dafür, dass GLP-1 auch zur Steuerung der Nahrungsaufnahme beiträgt. Allerdings ist unklar, wo sich die GLP-1-Rezeptoren (GLP-1R) befinden, über die das Essverhalten beeinflusst wird, und ob endogenes, intestinales GLP-1 für die Steuerung der Nahrungsaufnahme physiologisch relevant ist. Zusätzlich sind weder das Muster noch das Ausmass der GLP-1-Freisetzung nach einer Mahlzeit bei Ratten bekannt. Diese Fragen werden in der vorliegenden Dissertation behandelt.

In der ersten Reihe von Experimenten untersuchten wir, wo GLP-1 wirkt, um die Nahrungsaufnahme zu hemmen sowie die Rolle von vagalen Afferenzen bei diesem Effekt. Weil gezeigt wurde, dass vagale Afferenzen aus der Gegend der Leberpforte für die volle Ausprägung des GLP-1-Effekts auf die Insulinfreisetzung notwendig sind, vermuteten wir zunächst, dass auch der Hemmeffekt von GLP-1 auf die Nahrungsaufnahme von den GLP-1R im Bereich der Leberpforte vermittelt wird. Wir überprüften diese Hypothese, indem wir zuerst den Einfluss von GLP-1-Infusionen in die HPV und die Vena Cava (VC) auf das Fressverhalten von Ratten verglichen. Anschliessend führten wir intraperitoneale (IP) und HPV-Infusionen von GLP-1 bei neural intakten Ratten und Ratten nach selektiver subdiaphragmatischer vagaler Deafferentation (SDA) durch. In der zweiten Experimentalreihe untersuchten wir die physiologische Relevanz von GLP-1 bei der Kontrolle des spontanen Verzehrs. Dazu infundierten wir den GLP-1R-Antagonisten Exendin (9-39) (Ex (9-

39)) während Mahlzeiten IP. In der dritten Experimentalreihe bestimmten wir den Effekt von Mahlzeiten mit gemischtem Nährstoffgehalt und von GLP-1-Infusionen in die HPV auf die Konzentrationen der aktiven Form von GLP-1, sowie von Insulin und Glucose in der HPV und VC.

Vehikel (Veh), 0.3, 1 and 3 nmol/kg Körpergewicht (KG) GLP-1 wurden in die HPV infundiert. Ein und 3 nmol/kg GLP-1 reduzierten die Mahlzeitgrösse signifikant, beeinflussten aber die kumulative Nahrungsaufnahme oder die Grösse und Dauer nachfolgender Mahlzeiten nicht. Die Infusionen von 1 nmol/kg KG GLP-1 in die VC oder HPV von Ratten mit Kathetern in beiden Blutgefässen reduzierten die Mahlzeitgrösse gleichermassen. Dies lässt vermuten, dass der hemmende Effekt von GLP-1 auf den Verzehr nicht von GLP-1R in der HPV oder in der Leber abhängt. Als Nächstes verglichen wir den Effekt von HPV-Infusionen von Veh, 0.25, 0.5 and 1 nmol/kg GLP-1 bei spontan essenden Ratten nach SDA oder Scheinoperation (Sham). Dabei wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden. Schliesslich verglichen wir den Effekt von HPV und IP-Infusionen von 10 nmol/kg KG GLP-1 bei in denselben zwei Operationsgruppen. GLP-1-Infusionen in die HPV reduzierten wieder die laufende Mahlzeit bei SDA-Ratten, während die gleichen Infusionen IP bei diesen Ratten keinen Effekt hatten. Das lässt vermuten, dass IP aber nicht HPV appliziertes GLP-1 auf GLP-1R in der Lamina Propria der Dünndarmmukosa wirkt und diese vagalen afferenten Signale auslöst, während HPV appliziertes GLP-1 vermutlich direkt im Gehirn den Verzehr hemmt.

In der 2. Experimentalreihe wurden Ratten mit IP-Katheter verwendet. Zuerst überprüften wir die Effekte von 2.5, 5 und 10 nmol/kg GLP-1 auf die Nahrungsaufnahme. Nur 10 nmol/kg GLP-1 reduzierte die Grösse der laufenden Mahlzeit; 5 und 10 nmol/kg reduzierten auch die Dauer. Dann testeten wir IP-Infusionen von Ex (9-39) während der zweiten spontanen Mahlzeit in der Dunkelphase, d.h., ähnlich zu der Situation, in der Ex (9-39) gemäss des Berichts einer anderen Gruppe die Nahrungsaufnahme stimuliert. Weder 10 noch 30 nmol/kg Ex (9-39) führten in unserem Versuch zu einer Zunahme der Mahlzeitgrösse. Als Positivkontrolle infundierten wir IP 10 nmol/kg GLP-1 und 30 nmol/kg Ex (9-39) entweder zusammen oder einzeln. Wir beobachteten dabei, dass Ex (9-39) den sättigenden Effekt von GLP-1 blockierte. Offensichtlich erreicht Ex (9-39) somit die Rezeptoren, die den sättigenden Effekt von körperfremdem GLP-1 vermitteln, kann

aber den Effekt von körpereigenen GLP-1 nicht antagonisieren. Dies spricht dafür, dass GLP-1 unter diesen Bedingungen für die physiologische Sättigung nicht relevant ist.

In der letzten Experimentalreihe untersuchten wir, wie sich die Aufnahme einer 3 g-Mahlzeit aus gemischten Nährstoffen nach 5 h Futterentzug auf die Konzentrationen von aktivem GLP-1, Glucose und Insulin in der HPV und VC auswirkt. Die GLP-1 Konzentrationen in der HPV waren 6 und 15 min nach Mahlzeitbeginn signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu waren die GLP-1 Konzentrationen in der VC zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert. Die Glucose- und Insulinkonzentrationen waren in der HPV höher als in der VC und während der gesamten 20 min des Versuchs erhöht. Schliesslich untersuchten wir den Einfluss einer HPV-Infusion von 1 nmol/kg KG GLP-1 nach 3 h Futterentzug ohne Zugang zu Futter während des Versuchs. Die Blutproben wurden dabei nur aus der VC entnommen. HPV-Infusionen von GLP-1 erhöhten die GLP-1-Konzentrationen in der VC deutlich mehr als dies nach einer Mahlzeit in der HPV der Fall war. Die Insulinkonzentration erreichte ihren Höchstwert 6 min nach Infusionsbeginn und die Glucosekonzentration war 6 und 10 min nach Beginn der Infusion reduziert. Diese Resultate zeigen, dass Nährstoffe zu einer raschen Freisetzung von intestinalen GLP-1 führen und dass der Effekt von GLP-1 auf die Insulinfreisetzung bei basalen Glucosewerten limitiert ist. Ferner wird GLP-1 während der Mahlzeit zu einer Zeit freigesetzt, die für die Sättigung relevant ist. Zusätzlich unterstützt der Befund, dass die GLP-1-Konzentration in der VC nach Infusion von GLP-1 in die HPV erhöht war, die Möglichkeit, dass in die HPV infundiertes GLP-1 direkt im Gehirn wirkt, um den Verzehr zu hemmen.

Insgesamt stellten wir fest, dass HPV, VC oder IP-Infusionen von GLP-1 während spontanen Mahlzeiten bei Ratten die Mahlzeitgrösse reduzieren. Dieser Befund ist mit einer Rolle von GLP-1 bei der Sättigung vereinbar. Intravenöse Infusionen von GLP-1 scheinen dabei den Verzehr über eine Wirkung auf GLP-1R im Gehirn zu hemmen, während IP-Infusionen von GLP-1 dies vermutlich über Rezeptoren auf vagalen Afferenzen tun, die in der Lamina Propria der Darmmukosa enden, d.h., nahe dem Ort der Freisetzung von körpereigenem GLP-1. Obwohl GLP-1 nach Beginn der Mahlzeit rasch freigesetzt wird und somit an der Sättigung beteiligt sein könnte, waren wir letztlich nicht in der Lage, mit dem Einsatz eines GLP-1R-

## Zusammenfassung

Antagonisten Beweise für eine Sättigungswirkung von körpereigenem GLP-1 zu finden. Der Mechanismus und die physiologische Relevanz von intestinalem GLP-1 für die Sättigung während spontaner Mahlzeiten bei Ratten brauchen deshalb noch weitere Abklärung.