



Doctoral Thesis

Diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1) inhibition and eating

Author(s):

Schober, Gudrun

Publication Date:

2013

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009913758> →

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. 21168

**DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE-1 (DGAT-1)
INHIBITION AND EATING**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

GUDRUN SCHOBER

Mag.rer.nat, University of Vienna

Born March 9th, 1982

Citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner
Prof. Dr. med. vet. Thomas A. Lutz, co-examiner
Prof. Dr. Christian Wolfrum, co-examiner

2013

1 Summary

Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1), is one of two known DGAT enzymes that catalyzes the final step in triacylglycerol (TAG) synthesis. DGAT-1 is highly expressed in the small intestine, where it is involved in fat absorption, lipoprotein assembly, and regulation of plasma TAG levels. Initial evidence for the beneficial metabolic effects of DGAT-1 inhibition came from studies of a mouse model with genetic deletion of DGAT-1 (*dgat-1^{-/-}*). These mice are resistant to diet-induced obesity (DIO) and show improved insulin sensitivity. Expression of DGAT-1 only in the intestine of *dgat-1^{-/-}* mice reverses the resistance to DIO, suggesting that the beneficial effects of global DGAT-1 deficiency are primarily due to an intestinal action. Selectively inhibiting intestinal DGAT-1 might therefore be a promising approach to treat hypertriglyceridemia and obesity. The exact mechanism of the beneficial metabolic effects of DGAT-1 inhibition, and in particular its possible role in the control of eating, remain largely unknown.

Hence, the aim of the present thesis was to assess whether and under which conditions pharmacological DGAT-1 inhibition reliably reduces food intake and to begin to explore the possible mechanism(s) of such an action.

In the first set of experiments we investigated the acute effects of intragastric (IG) infusions of a small molecule DGAT-1 inhibitor (DGAT-1i) on eating and its related metabolic effects. Based on a series of previous studies in our laboratory, we explored the proposed relationship between an increase in enterocyte fatty acid oxidation (FAO) and a reduction in food intake (FI). IG DGAT-1i infusions reduced energy intake during an 8 h feeding period in high-fat diet (HFD)-fed rats, but scarcely in chow-fed rats. Furthermore, IG DGAT-1i infusion blunted the postprandial increase in serum TAG and increased circulating β -hydroxybutyrate (BHB) levels only in HFD-fed rats. DGAT-1i also lowered the respiratory quotient and increased intestinal, but not hepatic, protein levels of Complex III of the mitochondrial respiratory chain and of mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, a key enzyme in ketogenesis, in HFD-fed rats. These findings indicate that a diet rich in fat is

crucial for the eating-inhibitory effect of pharmacological DGAT-1 inhibition and suggest that the related increase in intestinal oxidation of dietary fat and ketogenesis contributes to the observed reduction in food intake.

In the next series of experiments we investigated the behavioral specificity of the eating-inhibitory effect of IG DGAT-1i by recording meal patterns in addition to cumulative food intake in HFD-fed rats. We also addressed the question of whether pharmacological DGAT-1 inhibition can stimulate the production and release of satiating gut peptides from enteroendocrine cells, such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) or peptide tyrosine tyrosine (PYY), which might contribute to the eating-inhibitory effect of DGAT-1 inhibition. Finally, because GLP-1 and PYY affect gastric emptying, we assessed the effect of DGAT-1i administration on gastric emptying of a HFD test meal. IG DGAT-1i infusion prolonged the first intermeal interval and increased the corresponding satiety ratio. Also DGAT-1i infusion reduced the second meal size and duration, whereas the size and duration of the first meal were not affected. Consistent with findings in *dgat-1^{-/-}* mice, acute IG DGAT-1i infusion led to a prolonged and enhanced meal-induced increase in hepatic portal vein (HPV) GLP-1 and PYY concentrations, which was accompanied by an inhibition of gastric emptying. These results show that an increase in GLP-1 and PYY plasma concentrations and the inhibition of gastric emptying could be causally related and might contribute to the eating-inhibitory effect of acute pharmacological DGAT-1 inhibition observed in HFD-fed rats.

In the final study we evaluated whether the eating-inhibitory effect of DGAT-1 inhibition is vagally mediated, and we employed immunohistochemical detection of the early gene product c-Fos to identify brain areas that might be involved in any centrally mediated effect of DGAT-1 inhibition. IG DGAT-1i infusions reduced food intake similarly in rats after subdiaphragmatic vagal deafferentation (SDA) or Sham surgery, indicating that vagal afferents from below the diaphragm are not necessary for the reduced food intake in response to DGAT-1 inhibition. Furthermore, we demonstrated that DGAT-1 inhibition activated mainly neurons in the nucleus of the solitary tract (NTS) in the brainstem, as shown by the increase in the number of c-Fos expressing cells.

In conclusion, the results presented in this thesis suggest that enterocyte, rather than hepatocyte, FAO, an enhanced release of satiating gut peptides, and an inhibition of gastric emptying contribute to the eating-inhibitory effect of a pharmacological small molecular DGAT-1 inhibitor. Further studies are necessary to critically examine which of these phenomena are in fact causally related to the inhibition of eating. Because the food intake reducing effect of DGAT-1 inhibition does not appear to be vagally mediated, the exact mechanism of how the peripheral actions of this drug are communicated to the brain and translated into neural signals that control food intake are also still elusive and require further investigations.

2 Zusammenfassung

Acyl CoA: Diacylglycerinacyltransferase-1 (DGAT-1) ist eines von zwei bekannten DGAT-Enzymen, welches den letzten Schritt in der Triglycerid (TG) Synthese katalysiert. DGAT-1 wird vor allem im Dünndarm exprimiert, wo es an der Fettresorption, der Lipoproteinsynthese und an der Regulierung der Plasma-TG beteiligt ist. Erste Hinweise auf eine positive Stoffwechselwirkung durch die Hemmung von DGAT-1 stammen aus Untersuchungen von DGAT-1 knock-out (DGAT-1^{-/-}) Mäusen. Diese Mäuse sind resistent gegen eine Diät-induzierte Adipositas (DIO) und zeigen unter anderem eine verbesserte Insulinsensitivität. Die selektive Expression von DGAT-1 im Darm von DGAT-1^{-/-} Mäusen führt jedoch zum Verlust dieser DIO-Resistenz. Dies deutet darauf hin, dass die positiven Auswirkungen eines globalen DGAT-1-Mangel in erster Linie auf dem Wegfall des DGAT-1-Effekts im Darm herrühren. Eine selektive Hemmung des DGAT-1 im Darm könnte daher ein vielversprechender Ansatz sein, um Hypertriglyceridämie und Adipositas zu behandeln. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser positiven Wirkungen einer Hemmung des DGAT-1 auf den Stoffwechsel und insbesondere seine mögliche Rolle bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme sind jedoch weitgehend unbekannt.

Die vorliegende Dissertation untersucht den Einfluss einer pharmakologischen Hemmung von DGAT-1 auf die Nahrungsaufnahme und beginnt, die zugrunde liegenden Mechanismen zu identifizieren.

In der ersten Reihe von Experimenten untersuchten wir den Einfluss eines intragastral (IG) verabreichten DGAT-1-Inhibitors (DGAT-1i) auf die Nahrungsaufnahme und die damit verbundenen Auswirkungen auf den Stoffwechsel bei Ratten. Basierend auf früheren Experimenten in unserem Labor, untersuchten wir die in diesen Studien postulierte Beziehung zwischen einer Stimulation der Fettsäureoxidation in den Darmepithelzellen und einer Hemmung der Nahrungsaufnahme. Die akute IG Infusion von DGAT-1i reduzierte die Energieaufnahme während des 8-stündigen Futterzugangs bei Ratten, die mit einer Hochfettdiät (HFD) gefüttert wurden, nicht jedoch bei Fütterung mit einer Standarddiät. Des Weiteren hemmte bei Ratten, die mit der

HFD gefüttert wurden, der IG verabreichte DGAT-1i den postprandialen Anstieg der Serum-TG und bewirkte einen Anstieg der zirkulierenden β -Hydroxybuttersäure (BHB). Ferner senkte der DGAT-1i den respiratorischen Quotienten und erhöhte die Proteinexpression des Komplex III der mitochondrialen Atmungskette und der mitochondrialen Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase. Letztere ist ein Schlüsselenzym in der Ketogenese. Dieser Effekt wurde im Darm von HFD-gefütterten Ratten beobachtet, nicht jedoch in der Leber. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine fettreiche Nahrung für die verzehrshemmende Wirkung der pharmakologischen DGAT-1-Hemmung von entscheidender Bedeutung ist. Des Weiteren lassen die Befunde vermuten, dass die gesteigerte intestinale Fettsäureoxidation und Ketogenese zur Verzehrsreduktion beitragen.

In der zweiten Serie von Experimenten untersuchten wir die Wirkung des IG infundierten DGAT-1i auf das Verzehrsmuster, zusätzlich zur Wirkung auf die kumulative Nahrungsaufnahme, bei HFD-gefütterten Ratten. Wir stellten uns auch die Frage, ob die pharmakologische Hemmung der DGAT-1 zu einer Stimulation der Produktion und Freisetzung von sättigenden gastrointestinalen Peptiden, wie „Glucagon-like peptide-1“ (GLP-1) oder „Peptid Tyrosin Tyrosin“ (PYY) aus enteroendokrinen Zellen führen kann, und ob diese Peptide gegebenenfalls zur verzehrshemmenden Wirkung der DGAT-1-Hemmung beitragen. Schließlich untersuchten wir auch einen möglichen Effekt des DGAT-1i auf die Magenentleerung einer HFD-Mahlzeit, da GLP-1 und PYY massgeblich die Magenentleerung beeinflussen. Die IG DGAT-1i Infusion verlängerte das erste Zwischenmahlzeit-Intervall und verstärkte den Sättigungseffekt der ersten Mahlzeit. Zusätzlich reduzierte die IG DGAT-1i Infusion die Grösse und Dauer der zweiten Mahlzeit, beeinflusste aber die Grösse und Dauer der ersten Mahlzeit nicht. Ähnlich wie bei DGAT-1^{-/-} Mäusen führte die akute IG DGAT-1i Infusion zu einem mahlzeit-induzierten Anstieg von GLP-1 und PYY in der Pfortader, der von einer Hemmung der Magenentleerung begleitet wurde. Zusammenfassend kann man deshalb sagen, dass zwischen den erhöhten GLP-1 und PYY Plasmakonzentrationen und der Hemmung der Magenentleerung ein kausaler Zusammenhang bestehen könnte. Beide Effekte

könnten wiederum zur verzehrshemmenden Wirkung der pharmakologischen DGAT-1 Hemmung bei HFD-gefütterten Ratten beitragen.

In der letzten Studie untersuchen wir, ob die durch die DGAT-1 Hemmung induzierte Verzehrsreduktion über vagale Afferenzen vermittelt wird. Des Weiteren führten wir immunohistochemische Untersuchungen durch, um eine eventuelle Veränderung der Zahl von c-Fos exprimierenden Zellen in verschiedenen Hirnarealen zu erfassen, die möglicherweise an der zentralen Vermittlung des DGAT-1i Effektes beteiligt sind. Das C-Fos Protein ist ein Marker für die Aktivierung von Neuronen. Die IG DGAT-1i Infusion reduzierte die Futteraufnahme bei Ratten nach selektiver subdiaphragmatischer vagaler Deafferentation (SDA) und bei neural intakten Kontrollratten gleichermassen. Dies lässt vermuten, dass vagale Afferenzen von unterhalb des Diaphragmas nicht für den verzehrshemmenden Effekt der DGAT-1 Inhibierung notwendig sind. Weiterhin zeigten wir, dass die Hemmung von DGAT-1 zur Aktivierung von Neuronen im NTS führt, da in diesem Gehirnbereich eine vermehrte Anzahl von c-Fos exprimierenden Zellen festgestellt wurde.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Dissertation darauf hin, dass eine gesteigerte Fettsäureoxidation in Enterozyten, anstatt Hepatozyten, sowie eine erhöhte Freisetzung von sättigenden intestinalen Peptiden und eine Hemmung der Magenentleerung zur verzehrshemmenden Wirkung eines pharmakologischen kleinmolekularen DGAT-1 Inhibitors beitragen könnten. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um einen tatsächlichen kausalen Zusammenhang zwischen diesen Phänomenen zu prüfen. Da es scheint, dass die Verzehrsreduktion durch die DGAT-1-Hemmung nicht vagal vermittelt wird, bedarf es bezüglich der genauen Mechanismen der Übertragung der durch den DGAT-1i ausgelösten peripheren Signale an das Gehirn ebenfalls weiterer Abklärungen.