

DISS. ETH NO. 21829

# **PPAR- $\alpha$ activation and control of eating**

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

for the degree of  
Doctor of Sciences

Presented by

**ELNAZ KARIMIAN AZARI**

M.Sc., University of Gent, Belgium  
Born on June 29<sup>th</sup>, 1982  
Citizen of Iran

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner  
Prof. Dr. Barry Levin, co-examiner  
Dr. Abdelhak Mansouri, co-examiner

2014

## Summary

The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) are transcription factors that are activated by various types of fatty acids as endogenous ligands. PPARs regulate the expression of enzymes involved in many physiological processes. PPAR- $\alpha$  is one of three well-recognized PPAR subtypes, which induces the expression of genes encoding enzymes involved in several metabolic pathways, in particular fatty acid oxidation (FAO) and ketone body production. PPAR- $\alpha$  is widely expressed in a variety of tissues, but its function has been studied almost exclusively in the liver. The physiological functions of PPAR- $\alpha$  in the small intestine, where exposure to fatty acids derived from diets or from lipolysis during food deprivation activate PPAR- $\alpha$ , has rarely been addressed. As intestinal FAO has recently been implicated in the control of eating, the possible stimulation of intestinal FAO by PPAR- $\alpha$  activation and its association with the control of eating was of particular interest.

More specifically, the present thesis investigated the possible site(s) of action and the mechanism(s) of the eating-inhibitory effects of PPAR- $\alpha$  agonists; Wy-14643, a high affinity synthetic, and oleoylethanolamide (OEA), an endogenous agonist.

The first experiments assessed the effects of intraperitoneal (IP) injection of Wy-14643 on eating and metabolism in high-fat diet (HFD)-fed rats. IP Wy-14643 injection reduced food intake by selectively increasing the latency to eat rather than decreasing meal size, suggesting that Wy-14643 induces mainly satiety rather than satiation. The effect of Wy-14643 appears to be behaviorally specific because there was no sign of avoidance. In addition, Wy-14643 did not affect hepatic portal vein (HPV) non-esterified fatty acid (NEFA) levels, but increased  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) levels 30 min after injection. Moreover, IP Wy-14643 lowered the respiratory quotient (RQ) in the first hour after injection and induced the protein expression of two rate-limiting enzymes in mitochondrial FAO and ketogenesis, i.e., carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (mHMG-CoAS2), in the intestine but not in the liver. The induction of CPT-1 and mHMG-CoAS2 expression was associated with a decrease in the number and area of intestinal lipid droplets primarily in the jejunum. Together, these data indicate that

an increased intestinal FAO and ketogenesis may contribute to the observed reduction in food intake after Wy-14643 injection.

In the second series of experiments, we found that IP injection of OEA reduced energy intake mainly at 1 h in both chow- and HFD-fed rats with a greater effect in HFD-fed rats. Furthermore, IP OEA injection increased plasma NEFA and BHB levels similarly in HPV and vena cava (VC) in the first hour, again with a stronger effect in HFD-fed rats. Similar to Wy-14643, OEA increased the protein expression of mHMG-CoAS2 in the jejunum of HFD-fed rats, but not in the liver, and without any change in other sections of the intestine or in chow-fed rats. These findings are consistent with the view that the eating-inhibitory effect of OEA in HFD-fed rats may, at least in part, be due to a stimulation of jejunal FAO and ketogenesis and the ensuing release of ketone bodies. We also explored the effect of OEA on circulating levels of the gastrointestinal tract (GI) satiation peptides glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide tyrosine-tyrosine (PYY) that might contribute to OEA's eating-inhibitory effect. In contrast to previous studies from other laboratories, we showed that OEA reduced (rather than enhanced) the meal-induced increase in circulating GLP-1 and PYY, indicating that these peptides are not involved in the eating-inhibitory effect of OEA under the conditions tested. In addition, we further investigated the role of vagal afferents in the satiety effect of OEA using rats with subdiaphragmatic vagal deafferentation (SDA). In this experiment IP OEA injection reduced food intake similarly in both sham and SDA rats. Therefore, contrary to general belief, we conclude that intact abdominal vagal afferents are not required for OEA's satiety effect.

Our third study focused on the satiety effect of Wy-14643 under *ad libitum* and food-deprivation conditions in chow-fed rats. IP injection of Wy-14643 reduced food intake in both *ad libitum* and food-deprived rats and again primarily by prolonging the latency to eat. In food-deprived rats, however, first meal size was also affected. Also, similar to the findings with OEA, the experiment in SDA rats showed that vagal afferents are not necessary for the eating-inhibitory action of Wy-14643.

Collectively, the results presented in this thesis show that PPAR- $\alpha$  activation decreases food intake mainly by prolonging the latency to eat. A stimulation of intestinal FAO may contribute to this effect at least when a HFD is consumed. In

addition, our findings show for the first time that vagal afferents are not necessary for the inhibition of eating by PPAR- $\alpha$  activation. Further studies are required to identify the exact mechanism that links peripheral PPAR- $\alpha$  activation to the CNS circuitry that controls eating. PPAR- $\alpha$  activation appears to be a viable approach to control caloric intake and body weight and may therefore have some potential for the treatment of obesity and related metabolic diseases.

## Zusammenfassung

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) regulieren als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen, die in zahlreiche physiologische Prozesse involviert sind. PPARs können unter anderem über verschiedene Arten von Fettsäuren, welche als endogene Liganden agieren, aktiviert werden. PPAR- $\alpha$ , als einer von bislang drei identifizierten PPAR-Subtypen, wird unter anderem durch fettreiche Nahrung oder Nahrungsentzug aktiviert, und beeinflusst dementsprechend die Expression mehrerer Gene, die eine wichtige Rolle im Stoffwechsel spielen, insbesondere bei der Steuerung der Fettsäureoxidation und der Ketogenese. Da PPAR- $\alpha$  auf diese Weise wesentliche Enzyme der Fettsäureoxidation und Ketogenese reguliert, spielt es auch eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Energiehomöostase. Obwohl PPAR- $\alpha$  in zahlreichen Geweben vorkommt, wurde bisher primär seine Funktion in der Leber untersucht. Seine Funktionen im Dünndarm, einem Gewebe mit einer hohen PPAR- $\alpha$  Expression, sind hingegen weitgehend unerforscht. Da kürzlich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der intestinalen Fettsäureoxidation und der Steuerung der Nahrungsaufnahme gefunden wurden, ist die Funktion von PPAR- $\alpha$  im Dünndarm und inwiefern die dortigen Effekte die Nahrungsaufnahme beeinflussen, von besonderem Interesse.

Die vorliegende Dissertation untersucht deshalb den Einfluss von PPAR- $\alpha$  Agonisten auf die Nahrungsaufnahme und versucht, zugrundeliegende Wirkorte und -Mechanismen zu identifizieren. Dazu wurden zwei verschiedene Agonisten verwendet: Wy-14643, ein synthetischer PPAR- $\alpha$  Agonist mit hoher Affinität und Oleoylethanolamide (OEA), ein endogener PPAR- $\alpha$  Agonist.

In der ersten Reihe von Experimenten untersuchten wir den Effekt der intraperitonealen (IP) Injektion von Wy-14643 auf die Nahrungsaufnahme und die damit verbundenen Auswirkungen auf den Stoffwechsel bei Ratten, die mit einer Hochfettdiät (HFD) gefüttert wurden. Die akute IP Injektion von Wy-14643 reduzierte die Energieaufnahme vor allem durch eine Verzögerung der Nahrungsaufnahme nach der Injektion und nicht über eine Reduktion der Mahlzeitengröße. Dies deutet darauf hin, dass Wy-14643 vor allem die Sättigung und weniger den Sättigungsprozess per se beeinflusst. Da die Injektion von Wy-14643 zu keinen Vermeidungsreaktionen führte,

lässt sich vermuten, dass der Effekt auf die Nahrungsaufnahme spezifisch und nicht durch Übelkeit oder andere Nebenwirkungen bedingt ist. Die Verabreichung von Wy-14643 führte zu keiner Veränderung der Plasmaspiegel von nicht-veresterten Fettsäuren (NEFA) in der Pfortader (HPV), bewirkte jedoch einen Anstieg von  $\beta$ -Hydroxybutyrat (BHB) 30 min nach der Injektion. Ferner bewirkte Wy-14643 eine Senkung des respiratorischen Quotienten (RQ) in der ersten Stunde nach der Applikation, sowie eine erhöhte Expression von Schlüsselenzymen der Fettsäureoxidation (Carnitine Palmitoyltransferase-1, CPT-1) und Ketogenese (mitochondriale 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase, mHMG-CoAS2), ausschliesslich im Jejunum, nicht jedoch in der Leber. Diese gesteigerte Expression von CPT-1 und mHMG-CoAS2 ging mit einer Verringerung der Zahl und Verkleinerung der intestinalen Fetttröpfchen im Jejunum einher. Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die gesteigerte, intestinale Fettsäureoxidation und Ketogenese nach der Verabreichung von Wy-14643 zur beobachteten Verzehrreduktion beitragen könnten.

In einer zweiten Serie von Experimenten konnten wir zeigen, dass auch die IP Injektion von OEA zu einer Reduktion der Energieaufnahme führte, vor allem bei Ratten die eine HFD erhielten, in geringerem Ausmass auch bei Ratten, die eine normale Labortierdiät erhielten. Darüber hinaus führte OEA zu einem Anstieg der Plasmakonzentrationen von NEFA und BHB in der Pfortader und in der Vena Cava, wobei dieser Effekt wiederum bei den mit HFD gefütterten Ratten stärker ausgeprägt war. Zudem bewirkte die IP Injektion von OEA bei nur dieser Gruppe von Ratten eine erhöhte Proteinexpression von mHMG-CoAS2 ausschliesslich im Jejunum, jedoch nicht in der Leber. Dies weist darauf hin, dass eine gesteigerte Fettsäureoxidation und Ketogenese im Jejunum und eine damit einhergehende erhöhte Freisetzung von Ketonkörpern möglicherweise zur Reduktion der Nahrungsaufnahme nach OEA Injektion bei HFD-gefütterten Ratten beiträgt.

Wir stellten uns ausserdem die Frage, ob OEA die Produktion und Freisetzung gastrointestinaler Sättigungshormone, wie glucagon-like peptide-1 (GLP-1) oder peptide tyrosine tyrosine (PYY), stimuliert und ob diese Hormone gegebenenfalls zur verzehrshemmenden Wirkung von OEA beitragen. Im Gegensatz zu Studien anderer

Autoren führte OEA in unseren Experimenten jedoch zu einer Reduktion der mahlzeitinduzierten Freisetzung von GLP-1 und PYY. Dies lässt vermuten, dass diese Peptide unter unseren Voraussetzungen nicht zur Verzehrsreduktion nach OEA-Injektion beitragen.

Schliesslich untersuchten wir, ob die beobachtete Verzehrsreduktion nach OEA-Injektion durch vagale Afferenzen vermittelt wird. Dazu injizierten wir OEA bei Ratten nach selektiver subdiaphragmatischer vagaler Deafferentation (SDA) und bei neural intakten Kontrollratten. OEA reduzierte die Futteraufnahme bei beiden Gruppen gleichermassen, Dies weist darauf hin, dass intakte vagale Afferenzen aus dem Abdomen entgegen anderslautenden Vermutungen nicht für den verzehrshemmenden Effekt von OEA notwendig sind.

In der dritten Studie untersuchten wir den Effekt von Wy-14643 bei Ratten, die mit normaler Labortierdiät gefüttert wurden und entweder *ad libitum* oder eingeschränkten Zugang zum Futter hatten. Die IP-Injektion von Wy-14643 führte bei beiden Gruppen zu einer Verzehrsreduktion, auch hier wieder primär über einen späteren Beginn der Nahrungsaufnahme. Darüber hinaus jedoch, reduzierte Wy-14643 bei Ratten nach Futterentzug auch die Grösse der ersten Mahlzeit. Ähnlich zu unseren Ergebnissen mit OEA, konnten wir auch für Wy-14643 zeigen, dass dieser Effekt nach SDA und bei intakten Ratten gleichermassen und somit unabhängig von vagalen Afferenzen auftrat.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Dissertation darauf hin, dass die Aktivierung von PPAR- $\alpha$  vorwiegend über einen verzögerten Mahlzeitbeginn die Energieaufnahme reduziert und dass zu diesem Effekt eine gesteigerte Fettsäureoxidation in Enterozyten beitragen könnte, vor allem wenn eine fettreiche Nahrung konsumiert wird. Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse zum ersten Mal, dass die Aktivierung von PPAR- $\alpha$  zu einer Verzehrsreduktion führt, die von intakten vagalen Afferenzen unabhängig ist. Weitere Studien sind notwendig, um die genauen Mechanismen der Übertragung der durch Wy-14643 und OEA ausgelösten peripheren Signale zum Gehirn zu untersuchen. Die hier vorliegenden Daten liefern jedoch wichtige Erkenntnisse für die Forschung im Bereich der Behandlung von Adipositas und der damit assoziierten Erkrankungen.