

DISS. ETH NO. 24833

Fatty acid oxidation and ketogenesis in energy homeostasis

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SHAHANA FEDELE

*Laurea Specialistica in Biologia applicata alle scienze della nutrizione,
Università degli Studi di Milano (Milan, Italy)*

born on 01.04.1988

citizen of Italy and Australia

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner

Prof. Dr. Barry Levin, co-examiner

Prof. Dr. Thomas Lutz, co-examiner

Dr. Abdelhak Mansouri, co-examiner

2018

Summary

To maintain a physiological balance between energy intake and energy expenditure, the brain integrates a wide range of signals from peripheral tissues. Upon eating, the gastrointestinal tract secretes several compounds to signal the brain the amount and composition of the ingested food. One of these signals is oleoylethanolamide (OEA), an oleic acid-derived amide. When administered intraperitoneally (IP), OEA binds to PPAR α , stimulates intestinal fatty acid oxidation (FAO) and ketogenesis, and reduces food intake. Based on these findings, we attempted to investigate how the OEA-induced stimulation of intestinal FAO may affect energy homeostasis and whether the reduction in food intake may be due to the increased levels of circulating ketone bodies (KB). We also tried to understand by which route such anorectic signal may be reaching the brain. At an early stage of the study, we observed and characterized pharmacologic side effects induced by IP-OEA (10 mg/Kg BW). OEA impaired rats' locomotion and induced abnormal motor behaviors concomitantly to the reduction in food intake. Attempts to dissociate the two phenomena failed, suggesting a causal relation between locomotor impairment and anorexia. Furthermore, neither spinal nor vagal afferents seemed necessary for these effects. Overall, our findings indicate that the observed anorectic effect of IP OEA is due to an off-target effect and does not recapitulate a possible physiological satiety effect of the compound.

We then shifted our focus on the contribution of central nervous system (CNS) FAO and ketogenesis to the maintenance of energy balance. Several studies modulated CNS FAO and observed changes in the eating behavior and metabolic profile of rodents. These studies, though, neglected the important fact that FAO in the brain occurs mainly in astrocytes. It remains unclear how astrocytes and neurons are interacting under these conditions. In a first set of experiments, we aimed at increasing

FAO specifically in the astrocytes by expressing a mutated form of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1mt) that is insensitive to inhibition by malonyl-coA. Unfortunately, our *in vivo* approach failed at showing any effects of such manipulation, most likely due to a low efficiency of the CRE-induced recombination of the *loxP* sites. On the contrary, our astrocyte stable cell line expressing CPT1mt evidenced a reduction in FAO and fatty acid (FA) synthesis combined with a decreased lactate production. In spite of our limited findings, we trust that targeting specifically FAO in astrocytes is crucial for a better understanding of lipid metabolism in the CNS and its role in energy homeostasis, but a different *in vivo* approach is required.

Finally, as astrocytes are capable of ketogenesis and central KB have been suggested as metabolic modulators of energy balance, we investigated the effects on energy homeostasis of the knockdown of *Hmgcs2*, the key enzyme of ketogenesis, in the basomedial hypothalamus of rats. Although this manipulation was not cell-specific, the results are presumably due to *Hmgcs2* knockdown in astrocytes because neurons do not express this enzyme. We found that in chow fed rats the knockdown of *Hmgcs2* increased satiation in the first hours of the dark phase and reduced the respiratory exchange ratio, suggesting a shift towards enhanced FAO. These changes were paralleled by changes in the gene expression of orexigenic neurons in the hypothalamus. With high-fat diet, the impact of the knockdown was less evident.

Overall, our work may have not provided clear answers concerning the contribution of peripheral or CNS FAO to the regulation of energy homeostasis, but it has, on one hand, questioned the physiological relevance of some metabolic manipulations and, on the other hand, suggested a new role for CNS, in particular astrocyte, ketogenesis in the regulation of energy homeostasis even under low-fat conditions.

Riassunto

Per garantire il mantenimento di un fisiologico equilibrio tra dispendio e introito energetico, il cervello integra una varietà di segnali derivanti dai tessuti periferici. Il tratto gastrointestinale, per esempio, per segnalare l'ingestione di cibo, secreta diverse molecole tra cui: Oleoylethanolamide (OEA), un'ammide dell'acido oleico. Amministrato intraperitonealmente (IP), OEA si lega al recettore alfa attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR α), stimola a livello intestinale l'ossidazione degli acidi grassi e la chetogenesi e riduce l'assunzione di cibo. Sulla base di questi risultati, abbiamo tentato di investigare come la stimolazione della β -ossidazione intestinale possa regolare l'omeostasi energetica, ipotizzando che la riduzione nell'ingestione di cibo possa essere dovuta all'aumento dei corpi chetonici in circolazione. Abbiamo inoltre cercato di capire come questo segnale anoretico possa raggiungere il cervello. Durante le fasi iniziali dello studio, abbiamo osservato e caratterizzato quelli che abbiamo definito come "effetti collaterali farmacologici" indotti dalla dose di 10mg/Kg IP OEA. OEA, infatti, compromette la normale deambulazione dei ratti e induce atti motori anormali nello stesso frangente temporale in cui riduce l'ingestione di cibo. Tentativi atti a dissociare i due fenomeni hanno fallito, suggerendo una correlazione tra la compromessa deambulazione e la riduzione del consumo di cibo. Inoltre, né afferenze vagali, né afferenze spinali sono risultate necessarie per gli effetti osservati. Complessivamente, i nostri risultati suggeriscono che gli effetti anoretici osservati dopo l'amministrazione di OEA IP non siano di rilevanza fisiologica, e che invece mascherino i reali effetti fisiologici di questo composto.

In un secondo momento, abbiamo spostato la nostra attenzione sul ruolo della β -ossidazione e chetogenesi a livello del sistema nervoso centrale (SNC) nel mantenimento dell'equilibrio energetico. Diversi studi hanno modulato la β -

ossidazione nel SNC e trovato cambiamenti a livello del comportamento alimentare e del profilo metabolico dei rodenti. Questi studi hanno però ignorato l'importante dato che la β -ossidazione nel cervello avviene per lo più negli astrociti. Rimane ancora oscuro come astrociti e neuroni interagiscano in queste condizioni. In un primo gruppo di esperimenti, abbiamo cercato di aumentare la β -ossidazione specificamente negli astrociti, esprimendo una forma mutata della carnitina palmitoiltransferasi 1, mutazione che rende l'enzima non più soggetto all'inibizione da parte di malonyl-coA. Sfortunatamente il nostro approccio "in vivo" ha fallito nel mostrare alcun effetto a livello metabolico, molto probabilmente a causa di una bassa efficienza della ricombinazione dei siti *FloxP*, mediata dalla proteina CRE. Al contrario, la linea cellulare esprime CPT1mt, a nostra sorpresa, possedeva una diminuita capacità ossidativa, una diminuita capacità di sintetizzare nuovi acidi grassi e una diminuita capacità di produrre lattato. Nonostante i risultati, siamo convinti che manipolare la β -ossidazione specificamente negli astrociti sia importante per meglio comprendere il metabolismo dei lipidi nel SNC. Ciò richiede però un migliore approccio in "vivo".

Infine, poiché gli astrociti sono capaci di chetogenesi e poiché sono stati suggeriti come possibili modulatori metabolici dell'equilibrio energetico, abbiamo investigato gli effetti del knockdown, nell'area baso-mediale dell'ipotalamo di ratti, di *Hmgcs2*, il principale enzima della chetogenesi, sull'omeostasi energetica. Nonostante questa manipolazione non era specifica per gli astrociti, i nostri risultati sono presumibilmente dovuti al knockdown di *Hmgcs2* negli astrociti, poiché i neuroni non esprimono questo enzima. Abbiamo osservato che, in ratti alimentati con una dieta di controllo, il knockdown di *Hmgcs2* aumenta il saziamento nelle prime ore della fase notturna e riduce il rapporto di scambio respiratorio, suggerendo un aumento dell'ossidazione dei lipidi. In parallelo, l'espressione di geni dei neuroni anorettici

dell'ipotalamo erano anch'essi cambiati. Quando la dieta era ad alto contenuto di grassi, però, gli effetti del knockdown erano meno evidenti.

In conclusione, anche se la nostra ricerca non ha fornito molte risposte circa il contributo della β -ossidazione, (periferica o a livello del SNC), alla regolazione dell'omeostasi energetica, ha, da una parte, messo in discussione la rilevanza fisiologica di alcune manipolazioni metaboliche e, dall'altra, proposto un nuovo ruolo per la chetogenesi a livello del SNC, in condizioni di una dieta a basso contenuto di grassi, nel controllo dell'omeostasi energetica.