



Doctoral Thesis

Effect of visceral and metabolic signals on orexigenic neuropeptides in the brain

Author(s):

Gallmann, Eva A.

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004903826> →

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. 15692

**EFFECT OF VISCERAL AND METABOLIC SIGNALS ON
OREXIGENIC NEUROPEPTIDES IN THE BRAIN**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

EVA ANNA GALLMANN
Dipl. Natw. ETH

born January 21, 1971
citizen of Zurich

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner
Prof. Dr. Gareth Williams, co-examiner

2004

I SUMMARY

Food intake is controlled by mechanisms of hunger and satiety. Peripheral signals reflect the energy status of the body and are integrated and interpreted by specialized brain regions. Sensing of an energy deficit activates feelings of hunger and initiates motor programs leading to food-seeking behaviour and food intake. The process of ingestion and digestion releases a chain of peripheral signals, which finally lead to meal termination and satiety. The aim of this thesis was to analyze the role of central orexigenic (food-intake stimulating) neuropeptides in mechanisms of increased food intake and their modulation by visceral and metabolic signals.

In a first set of experiments, we analyzed food intake and expression of hypothalamic orexigenic neuropeptides [e.g. orexin-A, melanin-concentrating hormone (MCH) and neuropeptide Y (NPY)] in response to a hypoglycaemic dose of insulin (50 IU/kg) in male Sprague-Dawley rats. Insulin was injected intraperitoneally (IP) to induce hyperphagia. The satiety peptide cholecystokinin (CCK) infused IP during meals or continuously for 60 minutes antagonized hyperphagia. Hypothalamic prepro-orexin and MCH mRNA were significantly increased in insulin-injected hypoglycaemic rats, as compared with fed controls. Continuous 60-minute IP infusion of CCK normalized hypothalamic prepro-orexin and MCH mRNA. NPY mRNA was not changed by either treatment. This suggests that pathways activated by insulin-induced hypoglycaemia and peripheral CCK-derived signals converge on hypothalamic orexin and MCH neurones. The changes in prepro-orexin and MCH mRNA expression suggest a role for orexin and MCH in insulin hyperphagia and its counteraction by CCK.

The second set of experiments used 48 hours of fasting to induce hyperphagia and to examine the roles of orexigenic peptides and the effect of IP CCK. Orexin-A peptide levels were measured in the lateral hypothalamic area (LHA) and in several target areas of orexin neurones. As prepro-orexin mRNA increases in the LHA of fasted animals, we expected a fasting-induced change of orexin-A peptide in the target areas of orexin neurones. We found a fasting-induced decrease in LHA orexin-A, an effect inverse to

the results on the mRNA level. An increased release and turnover at the synapse may explain this reduction of orexin-A peptide in the face of increased mRNA. Thus, the reduced peptide content might in fact reflect increased orexin signalling in fasting. Orexin-A in the medial hypothalamus was unchanged by fasting and by CCK. In the posterior brainstem, however, CCK increased the orexin-A content in fasted animals. This suggests a role for orexin-A in the posterior brainstem in the sensing of a CCK-derived signal and, possibly, in the attenuation of hyperphagia. In the septum, the combination of fasting and CCK reduced orexin-A compared with the fed controls. The septum is thought to have inhibiting effects on food intake induced by LHA activation. Thus, depending on the brain area examined, orexin-A seems to be regulated differently. This may reflect different sub-functions of orexin-A in energy balance control in these brain areas.

A third set of experiments was conducted to analyze the role of peroxisome-proliferator-activated receptor β (PPAR β) in insulin hypoglycaemia and hyperphagia and its influence on the hypothalamic orexigenic neuropeptides orexin-A, MCH and NPY. To address these questions, PPAR β -knockout (KO) mice with genetic background C57BL/6J and the corresponding wild-type (WT) mice were used. The KO mice showed a slightly more pronounced hyperphagia and hypoglycaemia after IP injection of insulin (2 U/kg) than the WT mice. Insulin tended to reduce liver glycogen in WT mice but not in KO mice. This may explain the greater hypoglycaemia and hyperphagia after insulin in KO mice. Insulin increased hypothalamic MCH and NPY peptide content in KO and in WT mice. Insulin reduced hypothalamic orexin-A content in WT mice, but had no effect on orexin-A in KO mice. Thus, orexin-A does not appear to be necessary for insulin-induced hyperphagia in KO mice. In general, the results suggest a role for PPAR β in control of glucose metabolism and a connection to some orexigenic neuropeptides.

The results of this thesis provide further evidence for a role of the hypothalamic orexigenic neuropeptides orexin-A, MCH and NPY, in the control of food intake. A better understanding of the mechanisms of hunger and satiety may help to develop

pharmacological interventions against disorders of food intake and diseases related to disturbed energy balance regulation.

II ZUSAMMENFASSUNG

Die Nahrungsaufnahme wird über Hunger und Sättigung reguliert. Das Gehirn empfängt und integriert dabei periphere Signale, die den Energiestatus des Organismus widerspiegeln. Bei einem Energiedefizit wird Hunger ausgelöst und motorische Programme aktiviert, welche die Nahrungssuche und Nahrungsaufnahme stimulieren. Nahrungsaufnahme und Verdauung wiederum aktivieren periphere Signale, die schliesslich zur Sättigung führen. Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung der Rolle einiger orexigener Neuropeptide bei Manipulationen, welche die Nahrungsaufnahme stimulieren, und die Beeinflussung dieser orexigenen Neuropeptide durch viszerale und periphere metabolische Signale.

In einer ersten Serie von Experimenten, die an männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt wurde, analysierten wir die Nahrungsaufnahme und die hypothalamische Expression von Prä-Pro-Orexin-mRNA, Melanin-konzentrierendem-Hormon (MCH)-mRNA und Neuropeptid-Y(NPY)-mRNA bei Tieren, die durch die intraperitoneale (IP) Injektion von Insulin hyperphag gemacht wurden. Das Sättigungshormon Cholezystokinin (CCK) antagonisierte diese Hyperphagie, wenn es während einer spontanen Mahlzeit oder kontinuierlich IP infundiert wurde. Die Prä-Pro-Orexin-mRNA und die MCH-mRNA im Hypothalamus waren bei den hypoglykämischen, nicht gefütterten Ratten signifikant höher als bei den gefütterten Kontrolltieren. Die kontinuierliche IP Infusion von CCK über 60 Minuten normalisierte diese erhöhten Werte. Die Expression der NPY-mRNA wurde durch CCK jedoch nicht beeinflusst. Die durch Insulin-Hypoglykämie und durch IP CCK aktivierten Signale scheinen demzufolge auf die Orexin- und MCH-Neurone im Hypothalamus zu konvergieren. Dies spricht für eine Rolle von Orexin und MCH bei der durch Insulin induzierten Hyperphagie und deren Antagonisierung durch CCK.

In der zweiten Serie von Experimenten untersuchten wir die Mechanismen der erhöhten Nahrungsaufnahme am Modell eines Futterentzugs für 48 Stunden und die Antagonisierung der Hyperphagie durch IP Injektion von CCK. Wir massen den Gehalt

des orexigenen Peptids Orexin-A mittels Enzym-Immunoassay in verschiedenen Hirnregionen, die Zielareale für Orexin-Neurone darstellen. Fasten reduzierte den Orexin-A-Gehalt des Lateralen Hypothalamus (LHA). Da durch Fasten gleichzeitig die Prä-Pro-Orexin-mRNA im LHA erhöht wird, könnte die Reduktion auf der Peptidstufe mit einem erhöhten Turnover an der Synapse erklärt werden. Fasten würde demnach in Wirklichkeit Orexin-A im LHA erhöhen. Orexin-A im Medialen Hypothalamus wurde weder durch Fasten noch durch IP CCK beeinflusst. Der kaudale Hirnstamm der gefasteten Tiere zeigte jedoch einen durch CCK erhöhten Orexin-A-Gehalt. Dies lässt eine Funktion für Orexin-A im kaudalen Hirnstamm beim „Fühlen“ des peripheren CCK-Signals vermuten, das für die Induktion einer positiven Energiebilanz nach der Nahrungsaufnahme steht. Dieser Effekt könnte an der Abschwächung der Hyperphagie durch IP CCK beteiligt sein. Im Septum wurde der Orexin-A-Gehalt durch die Kombination von Fasten und IP CCK im Vergleich zu den gefütterten Tieren reduziert. Das Septum könnte in Belohnungsmechanismen involviert sein, die im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme stehen, und an denen auch die LHA beteiligt ist. Jedenfalls wird vermutet, dass das Septum eher einen inhibierenden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat, die über die LHA stimuliert wird. Orexin-A wird also durch Fasten und IP CCK je nach untersuchter Hirnregion unterschiedlich reguliert. Dies könnte auf unterschiedliche Subfunktionen von Orexin-A in diesen Regionen im Rahmen der Energiehomöostase hindeuten.

In einer dritte Serie von Experimenten analysierten wir die Rolle von Peroxisomen-Proliferator-aktiviertem Rezeptor β (PPAR β) bei der durch Insulin induzierten Hyperphagie und die damit assoziierten Veränderungen im hypothalamischen Gehalt an den Neuropeptiden Orexin-A, MCH und NPY. Die Untersuchungen wurden an PPAR β -Knockout-(KO)Mäusen mit dem genetischen Background C57BL/6J und entsprechenden Wild-Typen (WT) durchgeführt. Die KO-Mäuse zeigten interessanterweise eine leicht verstärkte Hyperphagie und Hypoglykämie nach IP Injektion von Insulin (2 U/kg) am Beginn der Hellphase. Bei den WT-Mäusen war der Glycogen-Gehalt der Leber nach Insulin tendenziell reduziert, während sich das Leberglycogen der KO-Mäuse nach Insulin-Injektion nicht änderte. Dieser Unterschied

könnte ein Grund für den stärkeren hyperphagen Effekt von Insulin bei den KO-Mäusen sein. Die hypothalamischen Gehalte von MCH und NPY wurden bei KO- und WT-Mäusen durch die Insulin-Hypoglykämie erhöht. Interessanterweise reagierten die WT-Mäuse durch die Insulin-Hypoglykämie mit einer Reduktion von Orexin-A im Hypothalamus, während sich bei den KO-Mäusen keine Änderung von Orexin-A zeigte. Orexin-A scheint demnach für die erhöhte Nahrungsaufnahme der KO-Mäuse nach Insulin-Injektion nicht notwendig zu sein. Insgesamt sprechen die Daten für eine Rolle von PPAR β bei der Regulation des Glucose-Stoffwechsels und für eine Verbindung von PPAR β zu bestimmten orexigenen Neuropeptiden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation tragen zur Klärung der zentralen, neurochemischen Mechanismen von erhöhter Nahrungsaufnahme und Sättigung bei. Ein Verständnis dieser Prozesse hilft, pharmakologische Interventionsmöglichkeiten gegen Erkrankungen zu entwickeln, die durch Störungen des Essverhaltens oder des Energie-Haushalts gekennzeichnet sind.