

DISS. ETH NO. 25794

## **Brain metabolic sensing and energy homeostasis**

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

presented by  
NADJA WEISSFELD

M.Sc., Universität Potsdam (Germany)

born on 18.02.1988  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

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

2019

## SUMMARY

The physiological mechanisms maintaining the balance between energy intake and energy expenditure are complex and not fully understood. Peripheral metabolic signals have long been implicated in the control of eating, but it is still unknown by which mechanisms metabolites or their utilization affect eating; do they trigger a signal that is transmitted to the brain via afferent nerves or are they metabolized in the brain to affect eating? In this thesis, we started to test both possibilities.

In the first part, we examined whether the monocarboxylate transporter-2 (MCT2) in vagal afferent neurons (VAN) plays a role in the control of eating. To this end, we knocked down the MCT2 by bilateral nodose ganglia injection of a viral vector with shRNA targeting MCT2, or a non-target sequence, and recorded food intake in rats eating chow or a high fat diet (HFD, 60% fat). The MCT2 transports monocarboxylates such as lactate, pyruvate and beta-hydroxybutyrate across cell membranes and thus provides the basis for these metabolites' intracellular utilization. The knockdown efficiency was only 28%. Nevertheless, when the animals were eating chow, the MCT2 knockdown (MCT2kd) prolonged average meal duration and, after a 16 h fast, it almost doubled the size and duration of the second meal, indicating a substantial contribution of VAN MCT2 to meal size control under this condition. After the animals were switched to HFD, MCT2kd rats temporarily increased 12 h light phase food intake by increasing meal number, suggesting a role of VAN MCT2 in satiety. Overall, by showing that VAN MCT2 is involved in the control of eating under certain conditions, our data indirectly support the idea of a peripheral metabolic contribution to the control of food intake by VAN signaling.

In the second part, we used the inducible CreERT2-loxP system to test whether overexpression or knock-out of Sirtuin3 (SIRT3) specifically in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressing astrocytes affects food intake and metabolism in mice fed a low fat control diet or a high fat diet (HFD, 60% energy from fat). SIRT3 is a major mitochondrial deacetylase that deacetylates and, hence, activates several mitochondrial enzymes involved in different metabolic pathways, but in particular in fatty acid oxidation and ketogenesis. The astrocyte-specific SIRT3 knock-out (SIRT3ko) did not affect energy homeostasis or eating under both feeding conditions. The same was true for the astrocyte-specific SIRT3 overexpression (SIRT3ki) in mice on the control diet. However, the SIRT3ki caused changes in energy homeostasis and glucose metabolism in mice fed the HFD for 12 weeks. These mice exhibited an overall anabolic state with increased food intake but decreased energy expenditure, and a hypersecretion of insulin. These findings suggest that SIRT3ki in GFAP astrocytes can modulate central nervous system (CNS) metabolic signaling and whole body energy homeostasis and metabolism. The failure to verify the SIRT3ko for technical reasons and the comparatively small SIRT3 overexpression of 20% limit these interpretations.

Taken together, our results suggest a possible contribution of VAN metabolic sensing to the control of eating under certain conditions. Furthermore, astrocyte SIRT3 presumably does not play a major role in CNS metabolic sensing as part of the regulation of energy homeostasis. However, because of the unconfirmed (SIRT3ko) and limited (SIRT3ki) changes in SIRT3 expression that were achieved, these interpretations may underestimate the role of astrocyte SIRT3.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die physiologischen Mechanismen, welche die Balance zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch sicherstellen, sind sehr komplex und bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Periphere metabolische Signale sind schon seit langem mit der Steuerung des Essverhaltens in Verbindung gebracht, dennoch ist bis heute nicht bekannt über welche Mechanismen Metaboliten oder deren Abbauprodukte die Nahrungsaufnahme beeinflussen; lösen sie ein Signal aus, welches über die vagalen Afferenzen zum Gehirn übertragen wird oder ist deren Verstoffwechselung im Gehirn für die Steuerung des Essverhaltens zuständig? In dieser Dissertation begannen wir, beide Möglichkeiten zu untersuchen.

Im ersten Teil der Arbeit untersuchten wir, ob der Monocarboxylat-Transporter-2 (MCT2) in den Afferenzen des Nervus vagus (VAN) eine Rolle bei der Steuerung des Essverhaltens spielt. Hierfür injizierten wir bei Ratten bilateral in die Ganglia nodosa einen viralen Vektor mit gegen MCT2 gerichteter shRNA oder (ungerichteter RNA) durch, um die Expression des MCT2 zu reduzieren (knock-down) und massen die Futteraufnahme von Ratten beim Verzehr einer Standard- oder Hochfettdiät (HFD, 60% Fett). Der MCT2 ist für den Transport von Monocarboxylaten wie Lactat, Pyruvat und Beta-Hydroxybutyrat über die Zellmembran zuständig und ermöglicht dadurch ihre intrazelluläre Verstoffwechselung. Die Knock-Down-Effizienz war nur 28%. Als die Tiere mit der Standarddiät gefüttert wurden, führte die Reduktion der Expression von MCT2 (MCT2kd) dennoch zu einer Verlängerung der mittleren Mahlzeitendauer. Nach einer 16-stündigen Fastenperiode war bei den MCT2kd-Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten die zweite Mahlzeit deutlich vergrößert und verlängert, was für eine substantielle Beteiligung von VAN MCT2 an der Steuerung der Mahlzeitgröße unter

diesen Bedingungen spricht. Nach der Umstellung auf die HFD, zeigten die MCT2kd-Ratten vorübergehend während der 12-stündigen Hellphase eine erhöhte Mahlzeitenanzahl und Futteraufnahme. Dies weist darauf hin, dass der MCT2 in VAN unter diesen Bedingungen an der Aufrechterhaltung der Sättigung beteiligt ist.

Der Befund, dass der MCT2 in VAN unter bestimmten Bedingungen an der Steuerung der Nahrungsaufnahme beteiligt ist, unterstützt indirekt die Hypothese einer peripheren metabolischen Komponente der Steuerung der Nahrungsaufnahme über Signale in VAN.

Im zweiten Teil der Arbeit verwendeten wir das induzierbare CreERT2-loxP System, um zu untersuchen, ob eine Über- oder Unterexpression des Sirtuin3 (SIRT3), spezifisch in GFAP- (glial fibrillary acidic protein) exprimierenden Astrozyten, während der Aufnahme einer fettarmen oder fettreichen Diät (HFD), die Nahrungsaufnahme und den Metabolismus von Mäusen beeinflusst. SIRT3 ist eine wichtige Deacetylase, welche durch Deacetylierung mehrere mitochondriale Enzyme in unterschiedlichen Stoffwechselwegen, jedoch hauptsächlich in der Fettsäureoxidation und Ketogenese, aktiviert. Die Astrozyten-spezifische SIRT3 Unterexpression (SIRT3ko) zeigte unter beiden Fütterungsbedingungen keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme oder Energie-Homöostase der Mäuse. Analoges traf auch bei Mäusen mit Astrozyten-spezifischer SIRT3 Überexpression bei fettarmer Fütterung zu. Die SIRT3 Überexpression führte hingegen bei Mäusen, die vorher 12 Wochen der HFD ausgesetzt waren, zu Veränderungen der Energie- und Glukosehomöostase. Mit erhöhter Futteraufnahme und verringertem Energieverbrauch zeigten diese Mäuse insgesamt das Bild einer anabolen Stoffwechsellage parallel zu einer Hypersekretion von Insulin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die SIRT3 Überexpression in GFAP-Astrozyten metabolische Signale im Zentralnervensystem (ZNS) sowie die

Energiehomöostase des Organismus beeinflussen kann. Die missglückte Verifizierung des SIRT3<sup>ko</sup> aus technischen Gründen und die vergleichsweise geringe (20%) Überexpression von SIRT3 bei den SIRT3<sup>ki</sup>-Mäusen limitieren allerdings diese Interpretationen.

Insgesamt lassen unsere Ergebnisse unter bestimmten Bedingungen eine Beteiligung der VAN an der Erfassung und Weiterleitung peripherer metabolischer Signale bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme vermuten. Des Weiteren deuten die Resultate darauf hin, dass SIRT3 in Astrozyten keine wesentliche Rolle bei der Registrierung metabolischer Signale im ZNS im Rahmen der Regulation der Energiehomöostase spielt. Wegen der unklaren (SIRT3<sup>ko</sup>) beziehungsweise limitierten (SIRT3<sup>ki</sup>) Veränderungen in der Expression von SIRT3 könnte diese Interpretation allerdings die Rolle von SIRT3 in Astrozyten unterschätzen.