

Levensverlengende mechanismen van een laag proteïne dieet

NADJA VISSER

S2718774

Rijks Universiteit Groningen
Metabole Regulatie Research

28 juni 2017
Begeleider: J.K. Kruit

Samenvatting

Het aantal mensen dat langer dan eeuwen leeft wordt steeds groter. Het dieet blijkt van belang in het behalen van zo'n leeftijd. Na caloriereductie is nu ook proteïne restrictie aangetoond als een levensverlengende interventie. Belangrijke signalering zijn de IGF1/mTORC1/AMPK-signaleringroutes. Ook FGF21 blijkt van belang bij de proteïne inname. Deze signaalroutes hebben invloed op cellulaire processen die zijn betrokken bij veroudering. Autofagie en mitochondriale biogenese worden gezien als anti-verouderingsprocessen. Aan de andere kant induceren zuurstofradicalen cel-schade en daarmee veroudering. Op fysiologisch niveau bepaald de duur van een laag proteïne dieet of er sprake is van vetopslag. Andere fysiologische parameters zoals bloeddruk en insuline gevoeligheid zijn verbeterd na toediening van dit dieet, op welke termijn dan ook. Deze review bekijkt het samenspel van verouderingsmechanismen op zowel fysiologisch als op cellulair niveau. Zo kan de vraag hoe een laag proteïne dieet de levensduur verlengd worden beantwoord.

Inhoudsopgave

Afkortingen.....	3
Introductie.....	4
De mechanismen achter veroudering.....	5
<i>Het verouderingssignaal: Insuline en IGF1</i>	5
<i>De verwerking van het verouderingssignaal: metabole sensoren</i>	6
De effecten van een laag proteïne dieet op het verouderingsmechanisme.....	9
<i>Essentiële aminozuren</i>	9
<i>Aminozuren en metabole signalering</i>	10
Uitvoering van het laag proteïne dieet.....	12
<i>Onderzoek in de mens</i>	12
<i>De duur en samenstelling van het dieet</i>	13
Conclusie en discussie.....	14
Dankwoord.....	15
Referenties.....	16

Afkortingen

Afkorting	Betekenis
<i>LP/HK</i>	laag proteïne/hoog koolhydraat
<i>HP/LK</i>	hoog proteïne/laag koolhydraat
<i>P/K ratio</i>	proteïne/koolhydraat ratio
<i>LDL</i>	Low density lipoprotein
<i>HDL</i>	High density lipoprotein
<i>ATP</i>	Adenosine trifosfaat
<i>ROS</i>	Zuurstof radicalen
<i>IR</i>	Insuline Receptor
<i>IGF1</i>	Insulin like growth factor 1
<i>IGF1R</i>	Insulin like growth factor 1 receptor
<i>GH</i>	Groei Hormoon
<i>IIS</i>	insuline/insulin-like signalering
<i>IRS</i>	insuline receptor substraten
<i>PI3K</i>	Fosfatidylinositide-3-kinasen
<i>mTOR</i>	mammalian target of rapamycin
<i>AMPK</i>	AMP-activated protein kinase
<i>AMP</i>	Adenosine mono-fosfaat
<i>TSC</i>	Tuberous Sclerosis Complex
<i>ULK1</i>	UNC-51 like autophagy activating kinase1
<i>SIRT1</i>	NAD-afhankelijke deacetylase sirtuin1
<i>NAD</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide
<i>PGC1α</i>	Peroxisoom proliferater geactiveerde receptoren
<i>FGF21</i>	Enhanced fibroblast growth factor 21
<i>H₂O₂</i>	Waterstofperoxide
<i>PARP1</i>	Poly[ADP-ribose]polymerase1
<i>BCAA</i>	Branched Chain AminoAcids
<i>RAG</i>	Recombinatie-activerende genen
<i>DM2</i>	Diabetes Mellitus Type 2

Introductie

De mens wordt steeds ouder en de eerste mensen die ouder worden dan 120 zijn waarschijnlijk al geboren. Uiteindelijk zullen maar enkelen hiervan daadwerkelijk ouder worden dan 120. Een van de factoren die het verschil uit maakt is het dieet (Milte & McNaughton, 2016). De levensverlengende effecten van calorie restrictie zijn al enige tijd bekend. Proteïne restrictie blijkt echter ook een levensverlengend effect te hebben. Maar hoe kan een laag proteïne dieet zorgen voor een langere levensduur?

Bij caloriereductie wordt de dagelijkse calorie inname verminderd tot 20%-40% (Piper & Bartke, 2008). Dit heeft een levensverlengend effect in verschillende organismen, zoals wormen en muizen (Yuan et al., 2012; Weindruch & Sohal, 1997). Ook in mensen blijkt calorie restrictie een positieve invloed te hebben op het cardio metabole fenotype (Meyer et al., 2006; Stein et al., 2012). De toepasbaarheid van deze interventie op de hele bevolking is echter een probleem. In plaats van calorie restrictie zijn er tegenwoordig ook verschillende onderzoeken geweest die het effect van dieet-restrictie bestuderen. Bij dieet-restrictie blijft de totale inname van voedsel gelijk, alleen de samenstelling van de verschillende macronutriënten (proteïnen, vetten en koolhydraten) in het dieet is aangepast. Het totale aantal calorieën van de hoeveelheid voedsel wordt dus niet verminderd. (Trepanowski et al., 2011). De levensverlengende werking van calorie restrictie in fruitvliegen werd eerder al eens bekritiseerd: De levensverlenging komt waarschijnlijk door macronutriënt restrictie. (Carvalho, Kapahi, & Benzer, 2005; Mair, Piper, & Partridge, 2005). In Queensland fruitvliegen is inderdaad aangetoond dat macronutriënten een belangrijke rol spelen in het vergroten van de levensduur (Fanson et al., 2009). De samenstelling die het meest van belang bleek was de ratio van proteïnen en koolhydraten (Fanson & Taylor, 2012). Ook bij muizen zijn de effecten van macronutriënt samenstelling op de levensduur getest. Muizen blijken bij een laag proteïne en hoog koolhydraat (LP/HK) dieet langer te leven (Solon-Biet et al., 2014). Dit lijkt in overeenstemming met het onderzoek aan de Queensland fruitvlieg (Fanson & Taylor, 2012).

Naast dat een lage proteïne/hog koolhydraat dieet de levensduur vergrootte zijn er ook andere interessante observaties gedaan. In het eerdergenoemde onderzoek van Solon-Biet et al. (2014) blijken muizen op een LP/HK-dieet een lagere bloeddruk, een hogere HDL/LDL-ratio, een vermindering in triglyceriden en een verbeterde glucosetolerantie te hebben. Aan de andere kant hadden deze muizen wel een verhoogde hoeveelheid lichaamsvet en een vette lever wat normaliter geassocieerd wordt met een slechte gezondheid (Solon-Biet et al., 2014). Desondanks zijn deze fysiologische parameters in overeenstemming met een lager risico op hart en vaatziekten en gezonder ouder worden (Lagiou et al., 2012).

Belangrijk voor de macronutriënten signalering zijn de metabole sensoren in de cel. Deze eiwitten kunnen reageren op bijvoorbeeld aminozuren, hypoxie of ATP waarden (Saxton & Sabatini, 2017). Vervolgens worden processen in gang gezet die kunnen reageren op deze omstandigheden. Als ATP waarden laag zijn, kunnen katabole processen die ATP genereren worden aangezet en anabole processen die ATP verbruiken worden geremd (D. G. Hardie, 2011). Ook kunnen deze metabole sensoren reageren op bijvoorbeeld glucose en insuline (Pehmøller et al., 2009). Metabole sensor signalering is dus onmisbaar voor metabole processen in de cel. Aangezien aminozuren hier ook invloed op uit oefenen, zal een laag proteïne dieet deze signalering beïnvloeden. In deze review wordt beantwoord hoe een laag proteïne dieet de levensduur kan verlengen. Hierbij worden verschillende fysiologische en cellulaire processen behandeld die reageren op een laag proteïne dieet en die te maken hebben met veroudering.

De mechanismen achter veroudering

Om veroudering te meten wordt het cardio metabole fenotype gebruikt. Kenmerken hiervan zijn de bloeddruk, gewicht en samenstelling van gewicht, glucose/insuline tolerantie, circulerende lipiden en de vervetting van de lever. Ook wordt vaak de levensduur gemeten om aan te kunnen tonen dat bepaalde interventies levensverlengend zijn. Een combinatie van het cardio metabole fenotype en de daadwerkelijke levensduur geeft de beste weergave van het effect van een interventie. Bij veroudering is het metabole fenotype verslechterd. In ouderen vindt er meer vetopslag plaats, ook op plekken waar het niet gewenst is, zoals in de lever en de spieren. De insuline gevoeligheid gaat ook naar beneden wat diabetes mellitus type 2 (DM2) tot gevolg kan hebben. De bloeddruk en het LDL-cholesterol zijn verhoogd en er is meer kans op obesitas en een vette lever. Terwijl de vetmassa toeneemt bij veroudering, verdwijnt de spiermassa juist. (Gan, Chitturi, & Farrell, 2011).

Op celniveau zijn er verschillende processen die de mate van veroudering beïnvloeden, waaronder autofagie, mitochondriale biogenese en oxidatieve stress. Bij (macro)autofagie worden componenten van de cel afgebroken. Eerst wordt er een autofagosoom gemaakt die de af te breken componenten insluit, waarna deze vervolgens fuseert met het lysosoom. In levercellen vindt waarschijnlijk de meeste autofagie plaats, omdat hier meer lysosomen en meer lysosomale enzymen verblijven dan in andere type cellen (Czaja et al., 2013). Mitofagie is een vorm van autofagie waarbij de disfunctionele mitochondria worden opgeruimd. Op glycolyse na vinden de ATP genererende mechanismen plaats in de mitochondria, wat deze organellen de energiebron van de cel maken. Om deze reden is de aanmaak van mitochondria, mitochondriale biogenese, belangrijk. Dit moet echter in homeostase zijn met mitofagie, zodat niet-functionele mitochondria worden vervangen door werkende mitochondria. Een verstoring van de mitochondria homeostase blijkt gelinkt te zijn aan veroudering (Tatsuta & Langer, 2008). Als er te weinig mitofagie of te weinig mitochondriale biogenese plaats vindt, zijn er dus minder werkende mitochondria. Teveel mitofagie kan ook bijdragen aan een verslechterd integriteit van de mitochondria. Een goede mitochondriële integriteit staat gelijk aan verbetering van de gezondheid en werkt dus tegen veroudering (Tatsuta & Langer, 2008; Riera et al., 2016).

Tijdens processen in de cel worden zuurstofradicalen geproduceerd (ROS). ROS kunnen macromoleculen in de cel beschadigen, zoals DNA. Bij veroudering is er meer ROS gerelateerde DNA schade (Hamilton et al., 2001). De cel tracht zo min mogelijk ROS te produceren en heeft verschillende verdedigingsmechanismen hier tegen, in de vorm van antioxidant moleculen en enzymen (Hamilton, Walsh, & Van Remmen, 2012). De mitochondria zijn een bron van ROS-productie en deze productie wordt verhoogd als de mitochondriële functie verslechterd is, zoals bij veroudering. Door ROS-productie kan daarom ook mitofagie worden gestimuleerd, zodat de disfunctionele mitochondria kunnen worden opgeruimd. Deze negatieve feedback zorgt dus voor de opruiming van een grote ROS bron en een disfunctioneel mitochondrium (Filomeni, De Zio, & Cecconi, 2015). Dit is dus een belangrijk mechanisme om veroudering tegen te gaan.

Het verouderingssignaal: Insuline en IGF1

Een van de eerste mechanismen die impact bleek te hebben op de levensduur was de IGF1-insuline signaalroute. Bij remming van insulin-like growth factor 1 (IGF1) of groeihormoon (GH) wordt de levensduur verlengd (Coschigano et al., 2000; Flurkey et al., 2001). Insuline bindt aan een insuline receptor (IR) op het membraan waardoor verdere signalering kan worden uitgevoerd. Onder andere wordt via de IR een signaal gegeven om de GLUT4 glucose transporteurs naar het celmembraan te transporteren waardoor glucose kan worden opgenomen in de cel. Insuline signalering wordt vaak samen met IGF1 genoemd en maken samen onderdeel uit van de insuline/insulin-like signalering

(IIS). Endocrien IGF1 wordt in de lever geproduceerd, maar ook in andere weefsels (en) door lokale macrofagen (Chang et al., 2016). Een hormoon die ook ingrijpt op de IGF1 signalering is het GH. GH stimuleert de productie van IGF1 in de lever, waarna IGF1 de productie van GH kan remmen. IGF1 heeft veel functies in het lichaam, waaronder skeletspier ontwikkeling, remming van de lipolyse en stimulatie van lipogenese in vetweefsel, net als insuline. IGF1 kan binden aan de IGF-receptor (IGF1R). Door autofosforylatie van de IR en IGF1R kunnen de receptoren actief worden en daarmee insuline receptor substraten (IRS) rekruteren. IRS kunnen vervolgens verdere signalering uitoefenen via de zogenaamde PI3K signaalroute. (Sharples et al., 2015). Via IRS wordt ook het transport van glucose in spierweefsel en vetweefsel gereguleerd. Inhibitie van de PI3K signaalroute zorgt voor verstoorde insuline signalering (Cheatham et al., 1994).

De verwerking van het verouderingssignaal: metabole sensoren

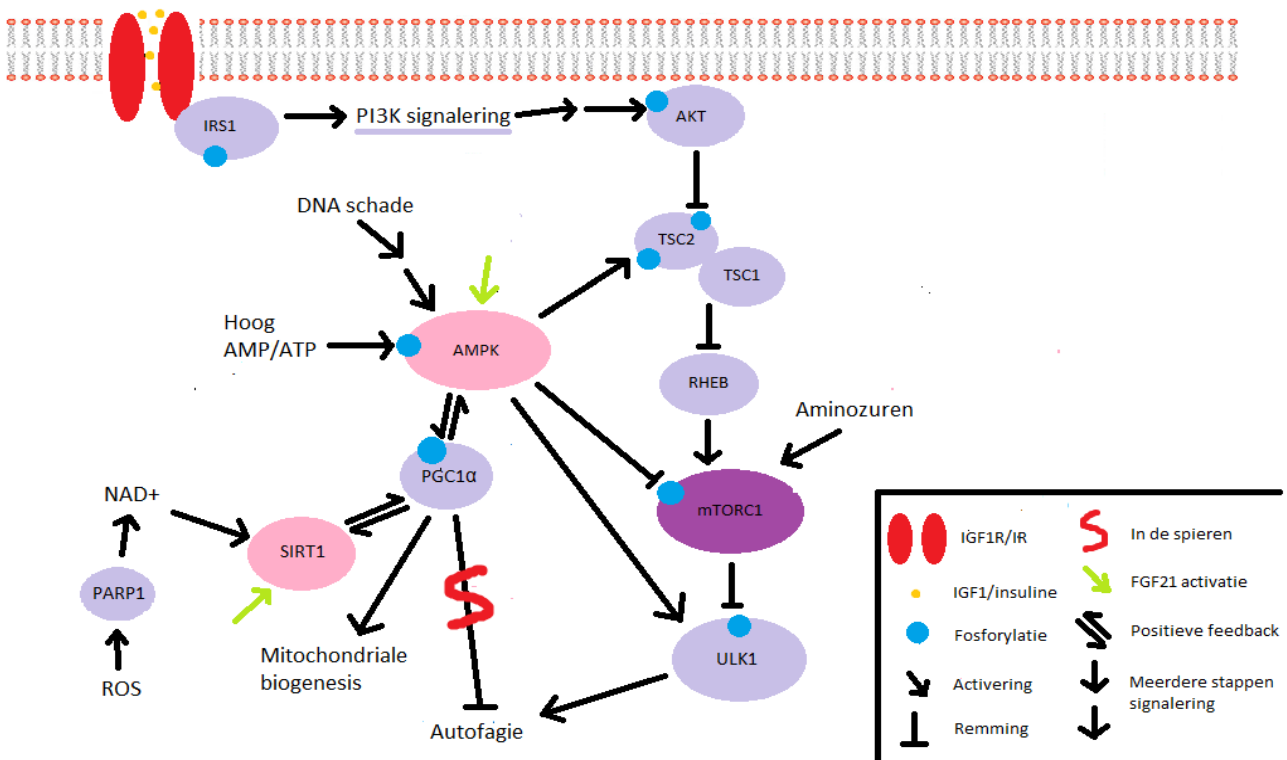
Aangezien IGF1 en insuline signalering veroudering beïnvloed, zijn de verdere onderliggende mechanismen van deze signalering ook verbonden aan veroudering. Zoals hierboven genoemd, zorgt IRS voor de activering van de PI3K signalering. Via de PI3K signaalroute wordt het eiwit Akt gefosforyleerd en daarmee geactiveerd. Akt is een proteïne kinase die zowel zorgt voor de glucose opname en remming van de omzetting van glycogeen in glucose. Daarnaast wordt via Akt ook de vetzuren synthese gestimuleerd (Hägglad Sahlberg et al., 2017). Deze kinase is verder belangrijk omdat het mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) activeert. mTORC1 is een serine/threonine proteïne kinase en is een belangrijke nutriënt sensor. Remmen van mTORC1 blijkt cruciaal als het gaat om een verbeterde gezondheid en een langere levensduur. Rapamycine, een antagonist voor mTORC1, remt mTORC1 activiteit en blijkt daarmee de levensduur te verlengen (Wilkinson et al., 2012). mTORC1 wordt geactiveerd door verschillende omstandigheden die te maken hebben met de mate van celgroei, zoals ATP-waarden (energie), hypoxie (zuurstof) en DNA-schade. Ook groeifactoren en aminozuren oefenen invloed uit op mTORC1 (Dibble & Manning, 2013; Saxton & Sabatini, 2017). Deze nutriëntensensor stimuleert de vorming van lipiden, eiwitten en nucleotiden, terwijl het katabole processen zoals autofagie tegen gaat (Hay & Sonenberg, 2004). Al deze processen dragen bij aan celgroei (D.-H. Kim et al., 2002).

Een andere belangrijke sensor in het verouderingsmechanisme is AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK wordt vaak samen genoemd met de nutriënt sensoren. AMPK neemt echter geen nutriënten waar maar energie. ATP is de voornaamste energiebron in de cel en mag dus niet te laag worden. AMPK wordt geactiveerd bij een hoge AMP/lage ATP-ratio (Suter et al., 2006; Burkewitz, Weir, & Mair, 2016). Verschillende metabole stressoren zoals hypoxie en hypoglykemie kunnen voor deze verlaging in ATP zorgen. Ook spiercontractie zorgt voor een verlaging in ATP en kan daarmee AMPK activeren (Towler & Hardie, 2007). Omdat er in het lichaam een goede energie homeostase is, is AMPK al actief bij kleine veranderingen in de AMP/ATP-ratio (D. Grahame Hardie & Hawley, 2001). Eenmaal geactiveerd kan AMPK de opname van glucose stimuleren door de GLUT4 glucose transporteur van het cytosol naar het plasmamembraan te transporteren (N. Kim et al., 2016). Andere effecten van AMPK zijn verhoogde vetzuroxidatie en vermindering van lipide synthese en gluconeogenese (B. B. Zhang, Zhou, & Li, 2009).

AMPK kan mTORC1 remmen via het Tuberous Sclerosis Complex (TSC) en daarmee de levensduur verlengen. TSC, wat bestaat uit TSC1 en TSC2. AMPK kan TSC2 fosforyleren waardoor het eiwit stabiel wordt (Inoki, Zhu, & Guan, 2003). TSC2 kan Rheb remmen, een belangrijke activator voor mTORC1. AMPK kan daarmee voorkomen dat mTORC1 actiever wordt (Long et al., 2005). Ook als een agonist voor AMPK wordt gegeven, wordt mTORC1 activiteit geremd (Kimura et al., 2003). Akt kan ook TSC2 fosforyleren. Hierdoor wordt het TSC complex ontkoppeld van het lysosomaal membraan

en laat het los van Rheb. Er is nu ruimte voor mTORC1 om aan het lysosomaal membraan te binden (Potter, Pedraza, & Xu, 2002) (figuur 1)

Zoals gezegd kan mTORC1 katabole processen zoals autofagie tegen gaan. De cel zal door de mTORC1 activiteit blijven groeien, maar beschadigde onderdelen zullen zich ophopen. Dit induceert veroudering. Autofagie is daarom strak gereguleerd door een samenspel van verschillende metabole sensoren. mTORC1 fosforyleert het ULK1 eiwitcomplex. Het ULK1 complex kan autofagie induceren door activatie via AMPK. mTORC1 voorkomt met de fosforylatie dat ULK1 wordt geactiveerd door AMPK en remt dus daarmee de autofagie (Czaja et al., 2013)(figuur 1). Autofagie kan ook worden gereguleerd door een meer mTORC1 onafhankelijke manier. AMPK kan samen met SIRT1 mitochondriale biogenese en autofagie induceren en kan daarmee bijdragen aan een gezonde mitochondriale homeostase. SIRT1 is een NAD⁺ afhankelijke lysine deacetylase. SIRT1 activatie heeft verschillende effecten, zoals een verbeterde insuline gevoeligheid en een verhoogde vetzuuroxidatie (Milne et al., 2007; Li, 2013) SIRT1 kan ook de gluconeogenese in de lever stimuleren (X. Li, 2013). In de skeletspieren kan SIRT1 PGC1 α deacetyleren waardoor het samen met AMPK een positieve feedback loop kan vormen. SIRT1 deacetylatisatie en AMPK fosforylatie van PGC1 α in de skeletspieren zorgt voor een verhoogde biogenese en een verlaagde autofagie (figuur 1). Dit gebeurt bijvoorbeeld bij lichamelijke beweging, wanneer de skeletspieren (extra) energie nodig hebben. Dit beschermd tegen het spier verlies zoals veel wordt gezien bij veroudering (Riera et al., 2016).



Figuur 1. De metabole sensoren zijn aangegeven in roze en donker paars. Alle eiwitten zijn niet op schaal weergegeven.

SIRT1 beschermt dus tegen mitochondriale disfunctie, maar het beschermt ook tegen oxidatieve stress. Deze bescherming geldt even goed voor de endotheelcellen van de bloedvaten. Zonder SIRT1 is er meer kans op hart- en vaatziekten zoals atherosclerose (Maiese, 2017). AMPK kan door zuurstofradicalen in de vorm van H_2O_2 worden geactiveerd. Daarnaast kan het eiwit PARP1 ROS waarnemen, daardoor wordt NAD^+ verhoogd en daarmee wordt via SIRT1 AMPK geactiveerd. Als laatste kan AMPK ook indirect worden geactiveerd door DNA-schade. Daarmee is AMPK een belangrijke schakel in het activeren van autofagie door ROS (Filomeni et al., 2015; Perrotta & Aquila, 2015). Door deze positieve invloed op cellulaire processen zijn AMPK en SIRT1 onlosmakelijk verbonden aan een verlenging van de levensduur. Om een goede homeostase te houden die veroudering remt is er voldoende communicatie nodig tussen deze mechanismen. Een nieuwere factor in deze communicatie is enhanced fibroblast growth factor 21 (FGF21). FGF21 kan SIRT1 en AMPK activeren en daarmee de positieve functies op het metabolisme induceren, zoals een verhoogde insuline gevoeligheid (Chau et al., 2010; Camporez et al., 2013). Aangezien een verhoging van AMPK en SIRT1 gerelateerd zijn aan een langere levensduur, zal FGF21 waarschijnlijk ook een belangrijke rol spelen in veroudering. In figuur 1 wordt het samenspel in mechanismen weergegeven.

De effecten van een laag proteïne dieet op het verouderingsmechanisme

Alle genoemde signaalroutes, sensoren en cel processen zijn met elkaar verbonden en hebben invloed op veroudering. Dit cellulaire mechanisme wordt beïnvloed door de verschillende macronutriënten, waaronder proteïnen. Proteïnen worden afgebroken tot aminozuren, waarbij deze op celniveau worden waargenomen. Om de invloed van een laag proteïne dieet op veroudering te begrijpen, is het noodzakelijk om eerst de invloed van aminozuren op het mechanisme te begrijpen.

Essentiële aminozuren

Aminozuren worden over het algemeen onderverdeeld in de essentiële en de niet-essentiële aminozuren. De eerste groep kan alleen via het voedsel in het lichaam komen, terwijl de laatste groep ook door het lichaam zelf kan worden geproduceerd. De branched chain amino acids (BCAA's) zijn essentiële aminozuren die in verschillende metabole functies participeren. Deze drie aminozuren zijn leucine, isoleucine en valine. BCAA's kunnen in verschillende weefsels worden omgezet tot α -ketonzuren door de aminogroep weg te halen. Na deze omzetting kan de lever α -ketonzuren oxideren tot producten zoals acetyl-CoA die de citroenzuurcyclus voeden voor ATP-productie. BCAA's hebben verschillende metabole effecten in zowel de lever als in vet- en in spierweefsel (S. Zhang et al., 2017).

Met name BCAA's blijken belangrijke aminozuren in het levensverlengende effect van een laag proteïne dieet. Een verhoging in circulerende BCAA's is gerelateerd aan een slechter metabool fenotype (Newgard et al., 2009). Bij een laag proteïne dieet zijn er minder circulerende essentiële aminozuren, waaronder ook BCAA's. Als essentiële aminozuren worden verlaagd, wordt mTORC1 minder geactiveerd. Dit heeft een langere levensduur tot gevolg (Emran et al., 2014). Onderzoek van Zhang et al. (2016) heeft het samenspel tussen BCAA's, de lever en het vetweefsel verduidelijkt. In de adipocyten kunnen BCAA's de lipolyse stimuleren. Dit kan via de activatie van AMPK. Door de lipolyse komen er meer vrije vetzuren in de circulatie. Deze vrije vetzuren kunnen door de lever worden opgenomen. Als hierdoor hyperlipidemie ontstaat, is er sprake van vrije vetzuur accumulatie in de lever. Aangezien BCAA's mTORC1 in de lever activeren, wordt de lipogenese en autofagie in de lever geremd. Deze omstandigheden zorgen voor vettoxiciteit in de lever en dit resulteert in een vette lever. Daarnaast is er ook sprake van insuline resistentie (F. Zhang et al., 2016).

Methionine en de BCAA leucine zijn beide essentiële aminozuren die veelal gelinkt zijn aan veroudering. Restrictie van deze aminozuren verlengt de levensduur (Miller et al., 2005; Alvers et al., 2009). Bij methionine restrictie, is er een stijging in insuline gevoeligheid in de lever en het vet- en spierweefsel. Voedsel inname en energie verbruik stijgen ook beide bij methionine restrictie (Hasek et al., 2013). Ook is er bij dit dieet sprake van een hogere omzetting van wit in bruin vetweefsel. Het is waarschijnlijk dat het verhoogde energie verbruik hier mee in verband staat, gezien bruin vetweefsel een verbetering in thermogenese tot gevolg heeft. Methionine restrictie verhoogd vetzuuroxidatie en lipogenese in het vetweefsel, terwijl het lipogenese in de lever verminderd (Wanders, Burk, et al., 2015).

Onderzoek van Wanders et al. (2015) naar leucine restrictie in muizen liet zien dat door alleen leucine in het dieet te verminderen de glucosetolerantie wordt verbeterd. De energie inname in deze muizen werd groter, maar ook werd het energie verbruik verhoogd. Opvallend in dit onderzoek is dat de insuline gevoeligheid beter werd in muizen op een laag leucine dieet. Dit vond echter alleen plaats in de lever. In het spierweefsel en vetweefsel was er geen verschil in insuline gevoeligheid tussen de controlegroep en de groep met het leucine restrictie dieet. Ook zorgde leucine restrictie voor een

verhoogde omzetting in wit vetweefsel naar bruin vetweefsel. Er zit een verschil in leucine deprivatie en leucine restrictie. Bij leucine deprivatie is lipogenese in zowel het vetweefsel als in de lever gedaald, terwijl bij leucine restrictie er geen verandering is in vetaanmaak in de lever. Leucine en methionine restrictie lijken op elkaar doordat beide de lipogenese in het vetweefsel stimuleren. (Wanders, Stone, et al., 2015). Het verschil tussen deze interventies laat zien dat het soort aminozuur en de mate van restrictie van belang is. Waarschijnlijk zal er een samenwerking in mechanismen zijn tussen de verschillende aminozuren en verschillende maten van restrictie.

Aminozuren en metabole signalering

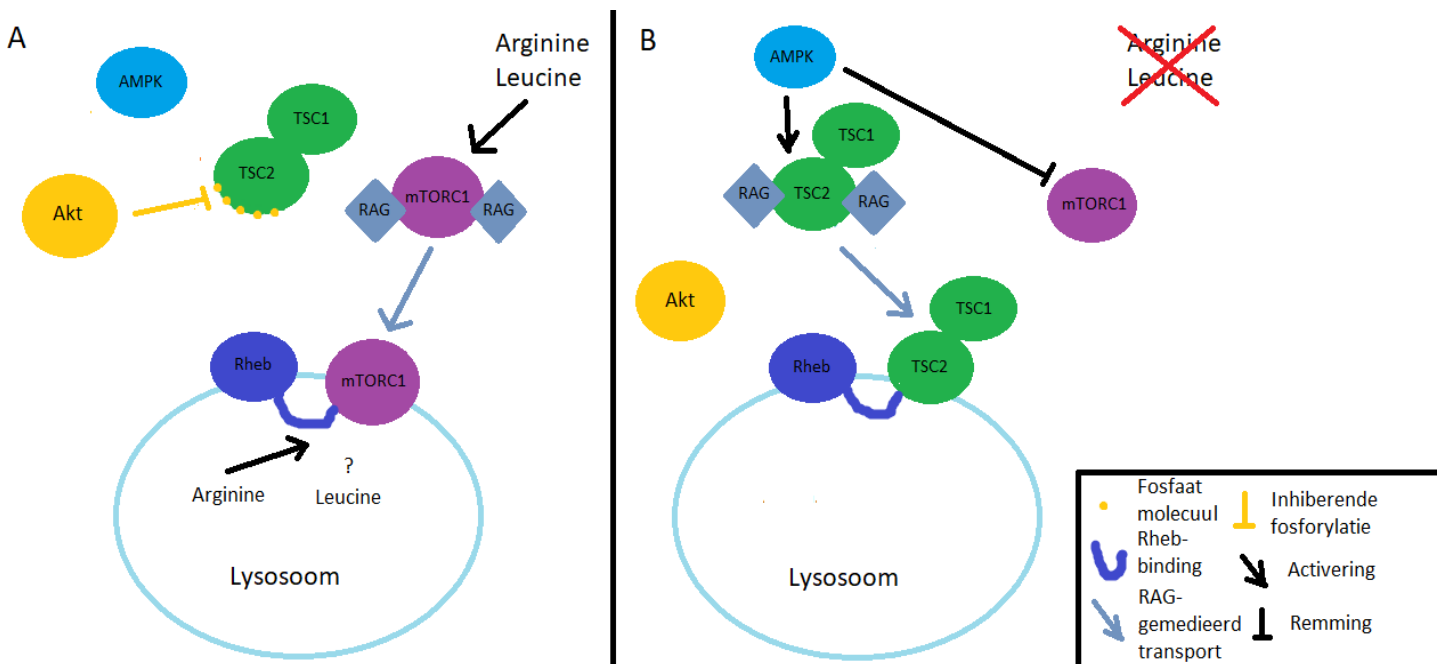
Bij aminozuurdeprivatie is het van belang om autofagie te induceren, omdat hierdoor weer nieuwe aminozuren kunnen worden gegenereerd. Aangezien aminozuren autofagie remmen, is het niet onverwacht dat aminozuur restrictie zorgt voor een verbetering van autofagie. De groep van Henagan et al. (2016) heeft dan ook aangetoond dat een laag proteïne dieet de autofagie in de lever stimuleert. Ook toonden zij aan dat mitochondriaal DNA en lipogenese waren afgenomen onder invloed van een laag proteïne dieet (Henagan et al., 2016). Door nutriënt restrictie en een agonist voor AMPK worden intracellulaire triglyceriden en de adipocyten-massa verminderd. Autofagie wordt door nutriënt restrictie en metformine gestimuleerd. Ook vetzuuroxidatie wordt gestimuleerd door beide interventies op een AMPK afhankelijke manier (Lettieri Barbato et al., 2013).

Proteïne inname heeft impact op de IGF1 signalering (Fontana et al., 2008). Proteïne restrictie blijkt deze signalering te verminderen en kan dus daarmee de levensduur verlengen. Nutriënten kunnen effect uit oefenen op de IGF1/GH-signalering. Insuline speelt hier ook een belangrijke rol in. Zo kan insuline de productie van IGF1 in de lever induceren en de lever gevoeliger maken voor GH. Tijdens vasten wordt de lever resistent voor de invloed van GH (Pierce et al., 2011; Levine et al., 2014). Op endocrien niveau blijkt ook FGF21 een belangrijke factor te zijn tijdens proteïne restrictie. Laeger et al. (2014) hebben FGF 21 gemeten in ratten, muizen en mensen. Bij alle organismen gingen FGF21 levels sterk omhoog bij een laag proteïne dieet. Ook hebben ze in dit onderzoek aangetoond dat FGF21 nodig is om de metabole respons te krijgen. Dit hebben ze gedaan door wildtype muizen en FGF21 deficiënte muizen op een laag eiwit dieet te zetten. Verandering in energieverbruik door beweging, voedsel inname en gewicht werden gemeten. Het dieet had op de FGF21 deficiënte muizen geen effect op deze metabole factoren, alleen op magere massa. In de wildtype muizen was er wel een duidelijk verschil tussen de toegediende diëten. Bij het laag proteïne dieet ging het energieverbruik en de voedsel inname omhoog en het gewicht omlaag (met name door een verlaging van de magere massa, niet zozeer de vetmassa) (Laeger et al., 2014). Ook in een leucine of methionine restrictie dieet blijken lever FGF21 levels gestegen (Wanders, Stone, et al., 2015; Wanders, Burk, et al., 2015)

Aminozuren kunnen mTORC1 activeren (Hara et al., 1998). Arginine en de Leucine zijn de voornaamste activators voor mTORC1 in het cytosol. Voor arginine is ook gebleken dat dit mTORC1 kan activeren via het lysosoom. Dit is echter nog speculatief voor leucine (Bröer & Bröer, 2017; Rebsamen et al., 2015). Als leucine mTORC1 activeert in de spieren, is dit positief voor anabole processen zoals eiwit en vet synthese. Naast aminozuren is ook insuline nodig dat via de Akt signaalroute mTORC1 kan activeren, zoals hierboven beschreven. De interactie tussen aminozuren en insuline om mTORC1 activeren blijkt niet in elk weefsel hetzelfde te zijn. Zo blijkt uit het onderzoek van Naito et al. (2013) dat in het spierweefsel insuline een prominentere rol heeft in het activeren van mTORC1, terwijl in de lever aminozuren een grotere bijdrage leveren in de mTORC1 activatie. In dit onderzoek werd gekeken naar de mate van autofagie, dat zoals eerder beschreven geremd wordt door mTORC1. Glucose bleek geen effect te hebben op de mate van autofagie in beide weefsels. Glucose had wel effect op de AMPK-activatie. Terwijl glucose zorgde voor een remming van AMPK

activiteit in het spierweefsel, was AMPK wel actief in de lever (Naito, Kuma, & Mizushima, 2013). Een laag proteïne dieet kan als gevolg hebben dat spiermassa verdwijnt of de groei van spieren minder wordt (Zheng et al., 2016). Hieruit is af te leiden dat een aminozuurdeprivatie verschillende effecten heeft in de lever en in het spierweefsel.

Om mTORC1 te activeren via arginine of leucine, zijn andere eiwitten nodig, waaronder de RAG en Rheb GTPases (Sancak et al., 2008)(E. Kim et al., 2008). RAG's kunnen in de aanwezigheid van aminozuren mTORC1 verplaatsen van het cytoplasma naar het lysosoom waar ook Rheb is (Sancak et al., 2008). Rheb kan mTORC1 stimuleren door een directe interactie aan te gaan (figuur 2) of door het induceren van een conformationele verandering wat een verhoogde substraat omzetting tot gevolg heeft (Groenewoud & Zwartkruis, 2013). Bij een aminozuur depletie zullen de RAG GTPases mTORC1 loslaten. mTORC1 bevindt zich dan in het cytoplasma en is inactief (Shimobayashi & Hall, 2016; Demetriades, Doumpas, & Teleman, 2014). Demetriades et al. (2014) hebben aangetoond dat het TSC complex belangrijk is bij het inactiveren van mTORC1 bij een gebrek aan aminozuren. Hierbij rekruteren RAG's TSC2 om deze vervolgens naar het lysosomaal membraan te begeleiden en daar Rheb te inactiveren. TSC2 bindt dus aan het lysosomaal membraan in plaats van mTORC1 als aminozuur hoeveelheden laag zijn (Demetriades et al., 2014) (figuur 2). Bij proteïne restrictie in niercellen van muizen blijken AMPK en TSC2 activiteit omhoog te gaan en mTORC1 activiteit verminderd. In deze cellen werd ook een verlaging in bloedglucose en gewicht waargenomen (Robertson et al., 2015). Bij een overschot aan aminozuren in een menselijke cellijn was AMPK-activiteit verlaagd en mTORC1 activiteit verhoogd (H. Li et al., 2014). Hieruit blijkt dat aminozuren een AMPK-verlagende



werking hebben en veroudering kunnen induceren.

Figuur 2. A. De effecten van de arginine en leucine op RAG-gemedieerd transport. B. De effecten van aminozuur depletie/restrictie op RAG gemedieerd transport. AMPK stabiliseert (activeert niet) het TSC complex.

Uitvoering van het laag proteïne dieet

Zoals gezegd is er veel onderzoek naar veroudering en het tegen gaan daarvan. Verschillende model organismen zijn voor verouderingsonderzoek gebruikt. Het uiteindelijke doel van deze onderzoeken is het begrijpen van het mechanisme achter veroudering en om een aanpak te ontwikkelen om veroudering uit te stellen in mensen. Het onderzoek wat in modelorganismen wordt gedaan is vaak een indicatie van hoe deze mechanismen in mensen werken. Het is moeilijk om exact hetzelfde onderzoek toe te passen op mensen. Dit betekent niet dat er helemaal geen onderzoek wordt gedaan naar veroudering bij de mens zelf. Als een onderzoek over langere periode wordt gedaan kunnen oorzaken van mortaliteit worden gemeten. Bij mensen moet deze periode echter tientallen jaren in beslag nemen om de mortaliteit mee te maken, dus wordt mortaliteit veelal anders uitgedrukt. Het meten van risico's op en de aanwezigheid van ziekten meet ook veroudering door verhoogde mortaliteit bij ziekte. Voorbeelden van deze ziekten zijn kanker, diabetes en hart- en vaatziekten.

Farmacologische middelen zouden ook kunnen worden gebruikt om veroudering tegen te gaan. Rapamycine (antagonist mTORC1), Resveratrol (SIRT1 agonist) en metformine blijken allemaal een levensverlengend effect te hebben na toediening in verschillende organismen (Emran et al., 2014; Hubbard & Sinclair, 2014; Martin-Montalvo et al., 2013). Voor levensverlenging is het dus mogelijk om een van deze middelen te nemen door het remmen of stimuleren van een van de metabole sensoren. Het probleem met farmacologische middelen is echter dat ze economisch gezien niet voor de hele bevolking beschikbaar zijn. Het dieet aanpassen is daarentegen een stuk toegankelijker. Hierbij moet wel worden gedacht aan de problemen die een dieetrestrictie met zich mee brengt. Bij zo'n dieet moeten veel verschillende soorten voedsel worden vermeden, wat niet simpel is met de huidige westerse levensstijl. Het dieet aanpassen is een meer natuurlijke manier om veroudering tegen te gaan dan het gebruik van farmacologische middelen, maar is minder specifiek.

Onderzoek in de mens

De groep van Levine et al. (2014) heeft aangetoond dat een laag proteïne dieet een vermindering geeft van de IGF1 signalering in mensen. Deze mensen hadden een verlaagde kans op kanker en over het algemeen een langere levensverwachting. Ook bleek er een sterke relatie te zijn tussen proteïne inname en diabetes gerelateerd overlijden. Hoe hoger de proteïne inname, des te meer overlijdens door diabetes. Deze relatie was significant ondanks dat het maar een kleine proef-groep was. Ook opvallend in dit onderzoek was dat de resultaten alleen geldig waren voor mensen onder de 65. Proteïne restrictie lijkt dus een goede manier om veroudering tegen te gaan, maar eenmaal aangekomen bij de leeftijd van 65 jaar blijkt er geen effect meer te zijn (Levine et al., 2014). Ziekten als kanker en diabetes blijken minder voor te komen in mensen met een GH-receptor deficiëntie. Verder is de insuline gevoeligheid bij deze mensen verhoogd en ook blijken ze minder DNA-schade te hebben en meer apoptose te kunnen induceren (Guevara-Aguirre et al., 2011). Aangezien IGF-signalering wordt geremd wordt ook de mTORC1 signaalroute geremd en daarmee groei. Remmen van groei maakt cellen resistenter tegen kanker (Guevara-Aguirre et al., 2011).

Lagiou et al. (2012) hebben in een groep Zweedse vrouwen aangetoond dat een laag koolhydraat en hoog proteïne dieet de kans op hart- en vaatziekten verhoogt (Lagiou et al., 2012). Gosby et al. (2016) hebben gekeken naar FGF21 en andere metabole factoren bij 3 verschillende P/K-diëten. Zij vonden onder andere dat circulerend FGF21 en energie inname stegen naarmate de hoeveelheid proteïnen afnam in het dieet. Ook was bij een reductie in proteïne inname de hoeveelheid circulerende lipiden verhoogd en het totale cholesterol verlaagt (Gosby et al., 2016).

De duur en samenstelling van het dieet

Op lange termijn blijkt een HP/LK-dieet een vergrootte kans op hart- en vaatziekten te geven (Lagiou et al., 2012). Solon-Biet et al. (2015) hebben na de resultaten van het eerdere onderzoek waarin ze hebben aangetoond dat muizen langer leven (Solon-Biet et al., 2014) ook gekeken naar metabole functies in muizen over acht weken. Een LP/HK-dieet gaf de beste resultaten qua metabool fenotype: hogere insuline gevoeligheid, lagere circulerende triglyceriden en hoger HDL-cholesterol. Ook was de lever minder poreus en vet en was er minder glucagon afgifte. Cellulaire respiratie was verhoogd, wat aangeeft dat koolhydraten de voornaamste energiebron waren. Lichaamsvet was afgenomen en energieverbruik toegenomen. Dit komt ook overeen met een verhoogde thermogenese. Deze fenotypische kenmerken waren juist verslechterd in een HP/LK-dieet (Solon-Biet et al., 2015). Over een langere periode blijken de muizen op een LP/HK-dieet wel overgewicht te hebben door meer vetweefsel en een vette lever. De andere positieve metabole kenmerken en een langere levensduur bleven wel behouden over een langere periode van een lage proteïne inname (Huang et al., 2013; Solon-Biet et al., 2014).

De samenstelling van macronutriënten speelt een rol in cel processen en de fysiologie. In de meeste onderzoeken wordt veelal gekeken naar de invloed van een enkele macronutriënt, terwijl de samenstelling van macronutriënten juist heel belangrijk is voor de processen in het lichaam. Ook is het van belang te weten waar de macronutriënten vandaan komen en wat de kwaliteit is van deze macronutriënten (Simpson, Le Couteur, & Raubenheimer, 2015). Proteïnen kunnen afkomstig zijn uit dieren of uit planten. Dat een hoog proteïne dieet meer kans geeft op hart en vaatziekten is hier boven genoemd (Lagiou et al., 2012). Deze studie heeft echter niet onderzocht of de ingenomen proteïnen van dierlijke of plantaardige afkomst waren. Eerder is onderzocht welke proteïnen nu de meeste kans gaven op hart- en vaatziekten. Vooral proteïnen uit rood vlees bleken een verhoogde kans te geven op hart- en vaatziekten. Plantaardige proteïnen of proteïnen uit vis en kip gaven juist een verlaagde kans op hart- en vaatziekten (Bernstein et al., 2010). Aangezien veroudering gepaard gaat met een verhoogde kans op hart- en vaatziekten, zou een vermindering van de kans op hart- en vaatziekten levensverlengend kunnen werken. Rood vlees zou dan veroudering induceren en eiwitten uit kip, vis of planten veroudering tegen gaan. Hier mist echter de link met koolhydraten.

Conclusie en discussie

In deze review zijn de verschillende mechanismen besproken waardoor een laag proteïne dieet voor een langere levensduur kan zorgen. De besproken mechanismen en eiwitten zijn niet de enige factoren die bijdragen aan de levensverlengende effecten van een laag proteïne dieet, maar ze spelen een grote rol. Als aminozuren, waaronder BCAA's als leucine, laag zijn wordt de IGF1/insuline/GH-signalering verminderd. Deze vermindering zorgt ervoor dat Akt niet gefosforyleerd wordt en daarmee inactief blijft. Hierdoor wordt het TSC-complex niet meer geremd en kan het binden aan Rheb. Doordat er minder leucine is en doordat de bindingsplaats aan Rheb op het lysosoom bezet is door TSC, wordt mTORC1 niet van het cytosol naar het lysosoom getransporteerd door RAG's en is daarmee inactief. AMPK is juist verhoogd in activiteit en draagt bij aan een langere levensduur. Bovendien zijn FGF21 levels verhoogd en induceren daarmee onder andere AMPK en SIRT1 activiteit. Deze metabole signaalroutes dragen bij aan verhoogde autofagie, mitochondriale biogenese en vermindering van oxidatieve stress en daarmee aan een verlengde levensduur. SIRT1 is ook een belangrijke factor in de bescherming tegen veroudering en werkt veelal samen met AMPK in het induceren van onder andere autofagie en mitochondriale biogenese. Het positieve effect van SIRT1 activatie op de levensduur is aangetoond in calorierestrictie (Chen et al., 2008; Canto & Auwerx, 2012; Srivastava, 2016). In de literatuur ontbreekt echter het effect van een laag proteïne dieet op SIRT1.

Eveneens heeft een LP/HK-dieet positieve effecten op het glucosemetabolisme. Insuline afgifte wordt verminderd en serum glucose is verlaagd. Dit duidt op een hogere insuline gevoeligheid. In de lever zal met een LP/HK-dieet de autofagie toenemen, aangezien mTORC1 wordt geremd. Op lange termijn blijkt er in de lever en het vetweefsel meer lipogenese te zijn, terwijl op korte termijn geen vervetting zichtbaar is. In zowel lange als korte periodes zijn serum triglyceriden verlaagd. Een verklaring hiervoor kan zijn dat deze worden omgezet in vetzuren en worden gebruikt voor vetzuuroxidatie in de spieren. Inderdaad neemt bij een LP/HK-dieet de mitochondriale biogenese toe zodat er meer ATP kan worden gegenereerd. Er zijn meer mitochondria aanwezig, waardoor er (meer) vetzuuroxidatie kan plaatsvinden. Al deze processen dragen bij aan een verbetering van de metabole gezondheid en een langere levensduur.

Veroudering lijkt door het induceren en remmen van de verschillende cellulaire processen een direct proces. Dit is echter onjuist. Veroudering is een langdurig proces en begint al op jonge leeftijd. Een voorbeeld hier van zijn hart en vaatziekten. Eenmalig een LDL-cholesterol verhogend dieet kan nooit voor hart- en vaatziekten zorgen. De rondcirculerende vetten kunnen aan de bloedvaatwand blijven plakken. Over een langere periode kan er steeds meer vet in de bloedvaatwand ophopen. Op een gegeven moment kan het bloedvat dichtslibben. Ook bloedpropjes kunnen ontstaan over langere tijd. Na vele jaren van ophoping kan zo'n propje loslaten en een infarct veroorzaken. Dit betekent ook dat als hart- en vaatziekten eenmaal bekend zijn, er niet direct iets aan is te doen via de voeding. Medicatie en operaties zijn directe middelen die kunnen worden toegepast voor symptoombestrijding, maar de toestand van de bloedvaten blijft verslechterd. Een LP/HK-dieet is geen directe interventie om het cardio metabole fenotype te verbeteren en daarmee niet meer geschikt voor mensen bij wie het kwaad al is geschied.

Zoals eerder genoemd is er geen effect van een laag proteïne dieet boven de 65 jaar in mensen. Ook nam de effectiviteit van het LP/HK-dieet af naarmate de mensen ouder werden. Bij veroudering, met name boven de 50, zijn er een aantal fysiologische veranderingen. Mensen boven de 50 jaar hebben namelijk meer verlies van spierweefsel en hebben meer kans op obesitas en DM2. Nu blijkt dat ouderen op een hoger proteïne dieet minder verlies van spiermassa en minder kans op obesitas en DM2 hebben (Kim et al., 2016). Veel onderzoeken zijn gericht op obesitas en DM2. Deze mensen

wordt juist geadviseerd om een HP/LK-dieet te nemen, aangezien ze hier mee afvallen. Daarnaast blijkt een HP/LK-dieet wel bevorderlijk voor de reproductie, omdat proteïnen belangrijk zijn voor groei. En aangezien in ouderen de spiermassa sneller afneemt, is groei van groot belang om de spiermassa te behouden. Ook sporters hebben baat bij spiergroei en dus bij proteïnen. Daarom is een laag proteïne dieet niet aan te raden voor zwangere vrouwen, ouderen en sporters.

Bij een HP/LK-dieet zijn BCAA's verhoogd. Verhoogde BCAA-levels zijn een kenmerk van obesitas. Door meer proteïnen te eten worden deze BCAA's alleen maar meer verhoogd. Overgewicht waarbij BCAA's niet sterk verhoogd zijn kunnen daarom wel profiteren van een LP/HK-dieet. In het laatste hoofdstuk van deze review is gebleken dat een LP/HK op korte termijn wel zorgt voor een verlaging van het gewicht. Voor mensen die al overgewicht hebben is een LP/HK-dieet op korte termijn wel degelijk een goede interventie. Daarnaast valt af te vragen of overgewicht wel in verband staat met een slechte gezondheid. Als bekend is dat een laag proteïne dieet het cardio-metabole fenotype verbeterd en minder kans geeft op ziekten, ondanks de toename in gewicht op lange termijn, is overgewicht misschien minder ongezond als in eerste instantie gedacht wordt. Als bekend is dat een LP/HK-dieet in verband staat met een hogere insuline gevoeligheid, zou dit misschien een oplossing zijn voor mensen met DM2. Echter is DM2 vaak het gevolg van overgewicht. Bij dieet is er dus sprake van kosten en baten: wat is het hoofddoel voor de persoon in kwestie. Spiermassa behoud in ouderen/sporters, goede reproductie en afvallen zijn gunstig bij een HP/LK-dieet. Het tegengaan van veroudering is echter ook van belang, aangezien veroudering de kans op ziekten verhoogd. Het is ook belangrijk om te kijken wat het meest gunstige dieet is per leeftijdsgroep, ziekte en situatie. Ook moet er naast de P/K-ratio extra gekeken worden naar de bron van het dieet, aangezien de verschillende soorten eiwitten en koolhydraten ziekten en veroudering op verschillende manieren beïnvloeden. Een LP/HK-dieet en de kennis van de onderliggende mechanismen geven daarom veel perspectieven om veroudering en ziekten tegen te gaan.

Dankwoord

Hierbij wil ik Janine Kruit bedanken voor haar begeleiding tijdens het bachelor onderzoek en de bachelor scriptie.

Referenties

- Alvers, A. L., Fishwick, L. K., Wood, M. S., Hu, D., Chung, H. S., Dunn Jr, W. A., & Aris, J. P. (2009). Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, 8(4), 353–369. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00469.x>
- Bernstein, A. M., Sun, Q., Hu, F. B., Stampfer, M. J., Manson, J. E., & Willett, W. C. (2010). Major Dietary Protein Sources and Risk of Coronary Heart Disease in Women. *Circulation*, 122(9), 876–883. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.915165>
- Bröer, S., & Bröer, A. (2017). Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochemical Journal*, 474(12). Retrieved from <http://www.biochemj.org/content/474/12/1935>
- Burkewitz, K., Weir, H. J. M., & Mair, W. B. (2016). AMPK as a Pro-longevity Target. *EXS*, 107, 227–256. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43589-3_10
- Camporez, J. P. G., Jornayvaz, F. R., Petersen, M. C., Pesta, D., Guigni, B. A., Serr, J., ... Shulman, G. I. (2013). Cellular Mechanisms by Which FGF21 Improves Insulin Sensitivity in Male Mice. *Endocrinology*, 154(9), 3099–3109. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1191>
- Canto, C., & Auwerx, J. (2012). Targeting Sirtuin 1 to Improve Metabolism: All You Need Is NAD+? *Pharmacological Reviews*, 64(1), 166–187. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003905>
- Carvalho, G. B., Kapahi, P., & Benzer, S. (2005). Compensatory ingestion upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods*, 2(11), 813–815. <https://doi.org/10.1038/nmeth798>
- Chang, H. R., Kim, H. J., Xu, X., Ferrante, A. W., & Jr. (2016). Macrophage and adipocyte IGF1 maintain adipose tissue homeostasis during metabolic stresses. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 24(1), 172–83. <https://doi.org/10.1002/oby.21354>
- Chau, M. D. L., Gao, J., Yang, Q., Wu, Z., & Gromada, J. (2010). Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK/SIRT1/PGC-1 β pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28), 12553–12558. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006962107>
- Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., & Kahn, C. R. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Molecular and Cellular Biology*, 14(7), 4902–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8007986>
- Chen, D., Bruno, J., Easlou, E., Lin, S.-J., Cheng, H.-L., Alt, F. W., & Guarente, L. (2008). Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes & Development*, 22(13), 1753–7. <https://doi.org/10.1101/gad.1650608>
- Coschigano, K. T., Clemmons, D., Bellush, L. L., & Kopchick, J. J. (2000). Assessment of Growth Parameters and Life Span of GHR/BP Gene-Disrupted Mice¹. *Endocrinology*, 141(7), 2608–2613. <https://doi.org/10.1210/endo.141.7.7586>
- Czaja, M. J., Ding, W.-X., Donohue, T. M., Friedman, S. L., Kim, J.-S., Komatsu, M., ... Yin, X.-M. (2013). Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy*, 9(8), 1131–58. <https://doi.org/10.4161/auto.25063>
- Demetriades, C., Doumpas, N., & Teleman, A. (2014). Regulation of TORC1 in Response to Amino Acid Starvation via Lysosomal Recruitment of TSC2. *Cell*, 156(4), 786–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.024>

- Dibble, C. C., & Manning, B. D. (2013). Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature Cell Biology*, 15(6), 555–64. <https://doi.org/10.1038/ncb2763>
- Emran, S., Yang, M., He, X., Zandveld, J., & Piper, M. D. W. (2014). Target of rapamycin signalling mediates the lifespan-extending effects of dietary restriction by essential amino acid alteration. *Aging*, 6(5), 390–8. <https://doi.org/10.18632/aging.100665>
- Fanson, B. G., & Taylor, P. W. (2012). Protein:carbohydrate ratios explain life span patterns found in Queensland fruit fly on diets varying in yeast:sugar ratios. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 34(6), 1361–8. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9308-3>
- Fanson, B. G., Weldon, C. W., P?rez-Staples, D., Simpson, S. J., & Taylor, P. W. (2009). Nutrients, not caloric restriction, extend lifespan in Queensland fruit flies (*Bactrocera tryoni*). *Aging Cell*, 8(5), 514–523. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00497.x>
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 377–88. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
- Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R. A., & Harrison, D. E. (2001). Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6736–6741. <https://doi.org/10.1073/pnas.111158898>
- Fontana, L., Weiss, E. P., Villareal, D. T., Klein, S., & Holloszy, J. O. (2008). Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging Cell*, 7(5), 681–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843793>
- Gan, L., Chitturi, S., & Farrell, G. C. (2011). Mechanisms and implications of age-related changes in the liver: nonalcoholic Fatty liver disease in the elderly. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 2011, 831536. <https://doi.org/10.1155/2011/831536>
- Gosby, A. K., Lau, N. S., Tam, C. S., Iglesias, M. A., Morrison, C. D., Caterson, I. D., ... Simpson, S. J. (2016). Raised FGF-21 and Triglycerides Accompany Increased Energy Intake Driven by Protein Leverage in Lean, Healthy Individuals: A Randomised Trial. *PloS One*, 11(8), e0161003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161003>
- Groenewoud, M. J., & Zwartkruis, F. J. T. (2013). Rheb and Rags come together at the lysosome to activate mTORC1. *Biochemical Society Transactions*, 41(4), 951–5. <https://doi.org/10.1042/BST20130037>
- Guevara-Aguirre, J., Balasubramanian, P., Guevara-Aguirre, M., Wei, M., Madia, F., Cheng, C.-W., ... Longo, V. D. (2011). Growth Hormone Receptor Deficiency Is Associated with a Major Reduction in Pro-Aging Signaling, Cancer, and Diabetes in Humans. *Science Translational Medicine*, 3(70), 70ra13-70ra13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001845>
- Hägglblad Sahlberg, S., Mortensen, A. C., Haglöf, J., Engskog, M. K. R., Arvidsson, T., Pettersson, C., ... Nestor, M. (2017). Different functions of AKT1 and AKT2 in molecular pathways, cell migration and metabolism in colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, 50(1), 5–14. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3771>
- Hamilton, M. L., Van Remmen, H., Drake, J. A., Yang, H., Guo, Z. M., Kewitt, K., ... Richardson, A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10469–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.171202698>
- Hamilton, R. T., Walsh, M. E., & Van Remmen, H. (2012). Mouse Models of Oxidative Stress Indicate a

- Role for Modulating Healthy Aging. *Journal of Clinical & Experimental Pathology, Suppl 4(S4)*. <https://doi.org/10.4172/2161-0681.S4-005>
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., & Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(23), 14484–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603962>
- Hardie, D. G. (2011). Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *American Journal of Clinical Nutrition*, *93*(4), 891S–896S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001925>
- Hardie, D. G., & Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays*, *23*(12), 1112–1119. <https://doi.org/10.1002/bies.10009>
- Hasek, B. E., Boudreau, A., Shin, J., Feng, D., Hulver, M., Van, N. T., ... Gettys, T. W. (2013). Remodeling the integration of lipid metabolism between liver and adipose tissue by dietary methionine restriction in rats. *Diabetes*, *62*(10), 3362–72. <https://doi.org/10.2337/db13-0501>
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, *18*(16), 1926–45. <https://doi.org/10.1101/gad.1212704>
- Henagan, T. M., Laeger, T., Navard, A. M., Albarado, D., Noland, R. C., Stadler, K., ... Morrison, C. D. (2016). Hepatic autophagy contributes to the metabolic response to dietary protein restriction. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *65*(6), 805–15. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.015>
- Huang, X., Hancock, D. P., Gosby, A. K., McMahon, A. C., Solon, S. M. C., Le Couteur, D. G., ... Simpson, S. J. (2013). Effects of dietary protein to carbohydrate balance on energy intake, fat storage, and heat production in mice. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *21*(1), 85–92. <https://doi.org/10.1002/oby.20007>
- Hubbard, B. P., & Sinclair, D. A. (2014). Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, *35*(3), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.004>
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, *115*(5), 577–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651849>
- Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., ... Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, *110*(2), 163–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150925>
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., & Guan, K.-L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology*, *10*(8), 935–945. <https://doi.org/10.1038/ncb1753>
- Kim, J. E., O'Connor, L. E., Sands, L. P., Slebodnik, M. B., & Campbell, W. W. (2016). Effects of dietary protein intake on body composition changes after weight loss in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, *74*(3), 210–24. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv065>
- Kim, N., Lee, J. O., Lee, H. J., Lee, Y. W., Kim, H. I., Kim, S. J., ... Kim, H. S. (2016). AMPK, a metabolic sensor, is involved in isoeugenol-induced glucose uptake in muscle cells. *The Journal of Endocrinology*, *228*(2), 105–14. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0302>

- Kimura, N., Tokunaga, C., Dalal, S., Richardson, C., Yoshino, K., Hara, K., ... Yonezawa, K. (2003). A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 8(1), 65–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12558800>
- Laeger, T., Henagan, T. M., Albarado, D. C., Redman, L. M., Bray, G. A., Noland, R. C., ... Morrison, C. D. (2014). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(9), 3913–22. <https://doi.org/10.1172/JCI74915>
- Lagiou, P., Sandin, S., Lof, M., Trichopoulos, D., Adami, H.-O., & Weiderpass, E. (2012). Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women: prospective cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 344, e4026. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735105>
- Lettieri Barbato, D., Tatulli, G., Aquilano, K., & Ciriolo, M. R. (2013). FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment. *Cell Death and Disease*, 4(10), e861. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.404>
- Levine, M. E., Suarez, J. A., Brandhorst, S., Balasubramanian, P., Cheng, C.-W., Madia, F., ... Longo, V. D. (2014). Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metabolism*, 19(3), 407–17. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.006>
- Li, H., Lee, J., He, C., Zou, M.-H., & Xie, Z. (2014). Suppression of the mTORC1/STAT3/Notch1 pathway by activated AMPK prevents hepatic insulin resistance induced by excess amino acids. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 306(2), E197–E209. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00202.2013>
- Li, X. (2013). SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45(1), 51–60. <https://doi.org/10.1093/abbs/gms108>
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., & Avruch, J. (2005). Rheb Binds and Regulates the mTOR Kinase. *Current Biology*, 15(8), 702–713. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.053>
- Maiese, K. (2017). Harnessing the Power of SIRT1 and Non-coding RNAs in Vascular Disease. *Current Neurovascular Research*, 14(1), 82–88. <https://doi.org/10.2174/1567202613666161129112822>
- Mair, W., Piper, M. D. W., & Partridge, L. (2005). Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 3(7), e223. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030223>
- Martin-Montalvo, A., Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Palacios, H. H., Mote, P. L., Scheibye-Knudsen, M., ... de Cabo, R. (2013). Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nature Communications*, 4, 2192. <https://doi.org/10.1038/ncomms3192>
- Meyer, T. E., Kovács, S. J., Ehsani, A. A., Klein, S., Holloszy, J. O., & Fontana, L. (2006). Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(2), 398–402. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.08.069>
- Miller, R. A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J. M., Sigler, R., & Smith-Wheelock, M. (2005). Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell*, 4(3), 119–125. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00152.x>
- Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., ... Westphal, C. H. (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 450(7170), 712–716. <https://doi.org/10.1038/nature06261>

- Milte, C. M., & McNaughton, S. A. (2016). Dietary patterns and successful ageing: a systematic review. *European Journal of Nutrition*, 55(2), 423–450. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1123-7>
- Naito, T., Kuma, A., & Mizushima, N. (2013). Differential contribution of insulin and amino acids to the mTORC1-autophagy pathway in the liver and muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21074–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456228>
- Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., ... Svetkey, L. P. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metabolism*, 9(4), 311–26. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>
- Pehmøller, C., Trebak, J. T., Birk, J. B., Chen, S., MacKintosh, C., Hardie, D. G., ... Wojtaszewski, J. F. P. (2009). Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297(3). Retrieved from http://ajpendo.physiology.org/content/297/3/E665?ijkey=0b6942b77be858541a1a81e9f8c05040a18becd6&keytype=tf_ipsecsha
- Perrotta, I., & Aquila, S. (2015). The role of oxidative stress and autophagy in atherosclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 130315. <https://doi.org/10.1155/2015/130315>
- Pierce, A. L., Breves, J. P., Moriyama, S., Hirano, T., & Grau, E. G. (2011). Differential regulation of Igf1 and Igf2 mRNA levels in tilapia hepatocytes: effects of insulin and cortisol on GH sensitivity. *The Journal of Endocrinology*, 211(2), 201–10. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0456>
- Piper, M. D. W., & Bartke, A. (2008). Diet and aging. *Cell Metabolism*, 8(2), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.012>
- Potter, C. J., Pedraza, L. G., & Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature Cell Biology*, 4(9), 658–665. <https://doi.org/10.1038/ncb840>
- Rebsamen, M., Pochini, L., Stasyk, T., de Araújo, M. E. G., Galluccio, M., Kandasamy, R. K., ... Superti-Furga, G. (2015). SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature*, 519(7544), 477–481. <https://doi.org/10.1038/nature14107>
- Riera, C. E., Merkwirth, C., De Magalhaes Filho, C. D., & Dillin, A. (2016). Signaling Networks Determining Life Span. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 35–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014451>
- Robertson, L. T., Trevino-Villarreal, J. H., Mejia, P., Grondin, Y., Harputlugil, E., Hine, C., ... Mitchell, J. R. (2015). Protein and Calorie Restriction Contribute Additively to Protection from Renal Ischemia Reperfusion Injury Partly via Leptin Reduction in Male Mice. *Journal of Nutrition*, 145(8), 1717–1727. <https://doi.org/10.3945/jn.114.199380>
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882), 1496–501. <https://doi.org/10.1126/science.1157535>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Sharples, A. P., Hughes, D. C., Deane, C. S., Saini, A., Selman, C., & Stewart, C. E. (2015). Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. *Aging Cell*, 14(4), 511–23. <https://doi.org/10.1111/acer.12342>

- Shimobayashi, M., & Hall, M. N. (2016). Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. *Cell Research*, 26(1), 7–20. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.146>
- Simpson, S. J., Le Couteur, D. G., & Raubenheimer, D. (2015). Putting the Balance Back in Diet. *Cell*, 161(1), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.033>
- Solon-Biet, S. M., McMahon, A. C., Ballard, J. W. O., Ruohonen, K., Wu, L. E., Cogger, V. C., ... Simpson, S. J. (2014). The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. *Cell Metabolism*, 19(3), 418–30. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.009>
- Solon-Biet, S. M., Mitchell, S. J., Coogan, S. C. P., Cogger, V. C., Gokarn, R., McMahon, A. C., ... Le Couteur, D. G. (2015). Dietary Protein to Carbohydrate Ratio and Caloric Restriction: Comparing Metabolic Outcomes in Mice. *Cell Reports*, 11(10), 1529–34. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.007>
- Srivastava, S. (2016). Emerging therapeutic roles for NAD(+) metabolism in mitochondrial and age-related disorders. *Clinical and Translational Medicine*, 5(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0104-7>
- Stein, P. K., Soare, A., Meyer, T. E., Cangemi, R., Holloszy, J. O., & Fontana, L. (2012). Caloric restriction may reverse age-related autonomic decline in humans. *Aging Cell*, 11(4), 644–650. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00825.x>
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., & Neumann, D. (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32207–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606357200>
- Tatsuta, T., & Langer, T. (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *The EMBO Journal*, 27(2), 306–14. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601972>
- Towler, M. C., & Hardie, D. G. (2007). AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circulation Research*, 100(3). Retrieved from <http://circres.ahajournals.org/content/100/3/328#ref-18>
- Trepanowski, J. F., Canale, R. E., Marshall, K. E., Kabir, M. M., & Bloomer, R. J. (2011). Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutrition Journal*, 10(1), 107. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-107>
- Wanders, D., Burk, D. H., Cortez, C. C., Van, N. T., Stone, K. P., Baker, M., ... Gettys, T. W. (2015). UCP1 is an essential mediator of the effects of methionine restriction on energy balance but not insulin sensitivity. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(6), 2603–15. <https://doi.org/10.1096/fj.14-270348>
- Wanders, D., Stone, K. P., Dille, K., Simon, J., Pierse, A., & Gettys, T. W. (2015). Metabolic responses to dietary leucine restriction involve remodeling of adipose tissue and enhanced hepatic insulin signaling. *BioFactors*, 41(6), 391–402. <https://doi.org/10.1002/biof.1240>
- Weindruch, R., & Sohal, R. S. (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *The New England Journal of Medicine*, 337(14), 986–94. <https://doi.org/10.1056/NEJM199710023371407>
- Wilkinson, J. E., Burmeister, L., Brooks, S. V., Chan, C.-C., Friedline, S., Harrison, D. E., ... Miller, R. A. (2012). Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell*, 11(4), 675–682.

<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00832.x>

- Yuan, Y., Kadiyala, C. S., Ching, T.-T., Hakimi, P., Saha, S., Xu, H., ... Feng, Z. (2012). Enhanced Energy Metabolism Contributes to the Extended Life Span of Calorie-restricted *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(37), 31414–31426.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.377275>
- Zhang, B. B., Zhou, G., & Li, C. (2009). AMPK: An Emerging Drug Target for Diabetes and the Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism*, *9*(5), 407–416.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.03.012>
- Zhang, F., Zhao, S., Yan, W., Xia, Y., Chen, X., Wang, W., ... Tao, L. (2016). Branched Chain Amino Acids Cause Liver Injury in Obese/Diabetic Mice by Promoting Adipocyte Lipolysis and Inhibiting Hepatic Autophagy. *EBioMedicine*, *13*, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.013>
- Zhang, S., Zeng, X., Ren, M., Mao, X., & Qiao, S. (2017). Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *8*(1), 10.
<https://doi.org/10.1186/s40104-016-0139-z>
- Zheng, L., Wei, H., He, P., Zhao, S., Xiang, Q., Pang, J., & Peng, J. (2016). Effects of Supplementation of Branched-Chain Amino Acids to Reduced-Protein Diet on Skeletal Muscle Protein Synthesis and Degradation in the Fed and Fasted States in a Piglet Model. *Nutrients*, *9*(1), 17.
<https://doi.org/10.3390/nu9010017>