

ZUSAMMENFASSUNG

Der Target of Rapamycin (TOR) Signalweg ist ein evolutionär hochkonserviertes Netzwerk, welches Nährstoffe detektiert und das Wachstum, den Metabolismus und Langlebigkeit reguliert. Reduktion der TOR Aktivität durch pharmakologische Interventionen (z.B. Rapamycin) oder Diäten (z.B. durch einen geringeren Protein-Gehalt), verlängert die Lebensspanne von vielen Modellorganismen von der Hefe bis hin zu Säugetieren. Obwohl Rapamycin potentiell auch für die Lebensverlängerung in Menschen geeignet sein könnte, limitieren Nebenwirkungen die Nutzung von Rapamycin. Diäten mit veränderter Aminosäure-Komposition zur Lebensverlängerung haben weniger Nebenwirkungen, jedoch sind die molekularen Mechanismen dieser Interventionen noch weitestgehend unbekannt.

In meiner Doktorarbeit habe ich die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellsystem verwendet, um die Wirkungsspanne von Rapamycin zur Lebensspannenverlängerung zu untersuchen. Mein Ziel war es, die Anwendung von Rapamycin auf einen kurzen Zeitraum zu limitieren, um die Nebenwirkungen zu reduzieren und die Wirkungsweise zu maximieren. Ich konnte zeigen, dass die kritische Zeitspanne für eine vollständige Lebensspannenverlängerung durch Rapamycin im frühen Erwachsenenalter der Fruchtfliege liegt. Die Anwendung von Rapamycin in den ersten 15 Tagen in adulten Fruchtfliegen war ausreichend um dieselbe Lebensspannenverlängerung zu erreichen, wie eine lebenslange Anwendung von Rapamycin. Außerdem hat die kurzzeitige Anwendung von Rapamycin eine langanhaltende Veränderung in der Darm-Struktur verursacht, welche die Fliege vor altersinduziertem Verlust der Darm-Barriere-Funktion beschützt. Interessanterweise konnte ich zeigen, dass Autophagie spezifisch in den Enterozyten des Darms aktiviert wird und ein wichtiger Faktor bei der Rapamycin-induzierten Darmgesundheit und der Lebensspannenverlängerung ist. Desweiteren konnte ich zeigen, dass die kurzzeitige Anwendung von Rapamycin Veränderungen in der Expression von Autophagie-assoziierten Proteinen und Anzahl der Lysosomen hervorruft, was auf erhöhte Autophagie selbst eine lange Zeit nach der Anwendung von Rapamycin hinweist. Rapamycin konnte auch im Maudarm Autophagie induzieren, was darauf hinweist, dass eine kurzzeitige Induktion von Autophagie im Darm eine vielversprechende Intervention zur Lebensspannenverlängerung auch in Säugetieren sein könnte.

Um die Effekte von Aminosäuren in der Ernährung auf die Lebensspanne und Gesundheit zu untersuchen, habe ich Fruchtfliegen und Mäuse verwendet. Ich konnte zeigen, dass die

Reduktion einer spezifischen Gruppe von Aminosäuren, den verzweigtkettigen Aminosäuren (= branched chained amino acids, BCAAs), die Lebensspanne verlängert und die Fruchtbarkeit von Fruchtfliegen reduziert. BCAA-Limitierung hat die Futterraufnahme und Fettdepots von Fliegen erhöht, was möglicherweise die Erhöhte Resistenz gegenüber Stress dieser Fliegen erklären könnte. Meine Daten weisen außerdem darauf hin, dass die verlängerte Lebensspanne durch reduzierte BCAAs durch eine verringerte Aktivität des TOR Signalweges verursacht worden sein könnte. Interessanterweise hat eine Reduzierung von drei anderen essentiellen Aminosäuren zu einer ähnlich erhöhten Lebensspanne, Futterraufnahme, Fettgehalt, Stress-Resistenz und verringerter Fruchtbarkeit geführt, was darauf hindeutet, dass die Menge der essentiellen Aminosäure und nicht deren Identität entscheidend ist. Die Reduktion beider Aminosäuregruppen hat auch teilweise altersinduzierte Darm-Pathologien verbessert, was möglicherweise die verlängere Lebensspanne erklären könnte. Dennoch hat die Reduktion von BCAAs oder drei anderen essentiellen Aminosäuren die Lebensspanne von Mäusen nicht verändert, sodass es in der Zukunft notwendig sein wird, die optimale Dosis von essentialen Aminosäuren für die Lebensspanne in Säugetieren zu ermitteln.

Zusammenfassend konnte ich in meiner Doktorarbeit zeigen, dass die Reduzierung des TOR Signalweges und daraus resultierende verbesserte Gesundheit durch zwei verschiedene Interventionen erreicht werden kann: durch kurzzeitige Induktion von Autophagie im Darm oder durch die Reduzierung von bestimmten essentiellen Aminosäuren ohne die Kalorienanzahl zu verändern. In der Zukunft könnten meine Ergebnisse dazu beitragen, die Lebensspanne von Menschen durch Diäten oder pharmakologische Interventionen zu verbessern.

SUMMARY

The target of rapamycin (TOR) signalling pathway is an evolutionarily highly conserved nutrient sensing network involved in the regulation of growth, metabolism and longevity. Down-regulation of TOR activity pharmacologically by using the drug rapamycin, or by dietary treatments such as protein-restriction extends lifespan in model organisms ranging from yeast to mammals. Despite the marked potential for translational applications of rapamycin as an anti-ageing intervention, adverse effects of this drug currently limit its use in clinical geroscience. Moreover, effects of dietary manipulations, specifically dietary amino acid manipulations on longevity, although causing only minor side-effects, are still not clear and the underlying molecular mechanisms mediating lifespan extension by these interventions remain elusive.

Here, I used the fruit fly *Drosophila melanogaster* as a model system to identify the stage in life critical for lifespan extension by rapamycin, in order to shorten treatment duration and hence maximize benefits, while minimizing side effects. I show that in flies the critical period for achieving full lifespan extension by rapamycin is early adulthood. Treatment in only the first 15 days of adult life was sufficient to extend lifespan as much as lifelong treatment. Moreover, short-term rapamycin treatment early in adulthood caused a long-lasting shift in intestinal architecture, protecting flies from age-related loss of intestinal barrier function. Importantly, I identified autophagy induction specifically in gut enterocytes as a causal factor in rapamycin-mediated amelioration of gut ageing and lifespan extension. Furthermore, I show that short-term rapamycin treatment caused autophagy-related-protein-level- and lysosome-number-changes in the gut, indicative of induced autophagy, which persisted for long time after the treatment was withdrawn. Finally, rapamycin treatment also induced autophagy in the mouse intestine, suggesting that short-term intestinal autophagy induction in adult life may provide a promising anti-ageing intervention in mammals.

To study the effects of dietary amino acid modulations on lifespan and health, I used flies and mice as a model system. I demonstrate that restriction of only a subset of amino acids, namely branched-chain amino acids (BCAAs), extends lifespan and reduces fecundity in flies. Moreover, BCAA-restriction increased food intake and lipid content, possibly driving the increased stress resistance observed in flies fed BCAA-restricted diet. Furthermore, my data indicate that BCAA-restriction extends lifespan through down-regulation of TOR signalling. Importantly, equal restriction of three other essential amino acids (EAAs) increased lifespan,

feeding, lipid content and stress resistance and reduced fecundity to the same degree, suggesting that the level of essential amino acids, rather than amino acid identity defines the response to essential amino acid restrictions. Restriction of both of these groups of amino acids partially ameliorated age-related loss of intestinal barrier function, possibly contributing to lifespan extension. Finally, lifespan of mice fed low protein diets with addition of BCAAs or other three EAAs remained unaffected and future studies should address the effects of different doses of the essential amino acids on murine lifespan.

In summary, my work implies that the benefits of reduced TOR activity can be achieved by short-term induction of intestinal autophagy or by reducing only a subset of EAAs, without restricting calories and thus in future may lead to development of dietary or pharmacological interventions to extend healthy lifespan in humans.