

**Life- and healthspan extension by
marine natural products in
*Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen- Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Navid Tahan Zadeh

Kiel, Dezember 2022

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweitgutachter: Prof. Dr. Holger Heine

Tag der Disputation: 19.1.2023

Summary

Organisms experience aging at cellular and organismal levels. In this inevitable consequence of life, the organs, tissues, and cells undergo functional decline stemming from the accumulation of cellular damage, e.g., genomic instability, telomere attrition, stem cell exhaustion, epigenetic alteration, dysregulated proteostasis, and deregulated nutrient sensing pathways. Due to the increase in life expectancy worldwide and its economical and medical health challenges, it is necessary to quest interventions that extend the life- and healthspan. Fortunately, aging seems to be modifiable and strategies such as exercise and diet show promising results to combat negative aspects of aging. However, these approaches are not sufficient to slow aging and interventions with less complexity and ease of implementation are required. In this regard, an alternative could be the development of drugs and the use of natural products with antiaging effects that can be used daily without adverse effects. Marine species have been used in drug development research to fight different diseases; however, their potential as antiaging agents have been mostly overlooked. In the current study, I studied the geroprotective effects of the marine brown alga *Eisenia bicyclis* and the halophyte plant *Salicornia europaea*. I discovered that the aqueous extracts of these species extended the lifespan of *Drosophila melanogaster* in a sex-specific manner that could be reproduced for different fly strains. Both extracts influenced the metabolism of flies by altering the glucose and TAG levels. I showed that in the flies fed with *Eisenia bicyclis* extract, the adverse effects of high-sugar and high-fat dieting on lifespan were rescued with greater effects on high-sugar diets indicating antidiabetic effects of the extract. Interestingly, even late administration of the *Eisenia bicyclis* extract was beneficial on a high-sugar diet. On the other hand, *Salicornia europaea* extract was beneficial on a high-fat diet but not a high-sugar diet which revealed the lipid-lowering effects of the extract. Additionally, these flies were more sensitive to starvation conditions. I found that interwoven insulin/insulin-like and Tor signaling pathways are required to extend the lifespan of flies, since the modification of these signaling pathways led to the hindrance of the beneficial effects of *Eisenia bicyclis* extracts. Moreover, the extract upregulated the expression of the pro-longevity gene *Sirtuin 6*. However, *Salicornia europaea* extract failed to extend the lifespan of *Tor* mutant flies whereas it was effective in lifespan extension in *foxo*-deficient animals. These results suggest *Salicornia europaea* mainly modifies the Tor signaling pathway. I also revealed that RNAi-depletion of *Tor* downstream effector S6 Kinase in the fat body abrogated the lifespan-extending effects of *Eisenia bicyclis* whereas this

manipulation in the enterocytes and skeletal muscle cells did not block the positive effect of the extract suggesting the fat-storing organ is the target organ of the *Eisenia bicyclis* extract. Similarly, manipulation of Tor signaling in the fat body by driving Tor dominant negative alleles in this fat-storing organ, abolished the extension in the lifespan of flies fed with *Salicornia europaea* extract. Moreover, I showed that the enterocytes (EC), intestinal stem cells (ISCs), and enteroblasts (EB) are not targets of the extract. I found that three weeks of treatment with the *Salicornia europaea* extract downregulated the expression of *impl2*, *foxo*, and *glut1*. In summary, *Eisenia bicyclis* and *Salicornia europaea* are two species with bioactive compounds that can be used as health-promoting food supplements.

Zusammenfassung

Biologische Organismen unterliegen dem Alterungsprozess auf zellulärer und organischer Ebene. In dieser unvermeidlichen Folge des Lebens kommt es zu einem Funktionsverlust von Organen, Geweben und Zellen, der auf die Anhäufung zellulärer Schäden zurückzuführen ist, z. B. genomische Instabilität, Telomerabnutzung, Stammzellenererschöpfung, epigenetische Veränderungen, gestörte Proteostase und deregulierte Nährstofferkennungswege. Angesichts der weltweit beschleunigten Alterungsrate und der damit verbundenen wirtschaftlichen und medizinischen Herausforderungen ist es notwendig, nach Maßnahmen zu suchen, die die Lebens- und Gesundheitsspanne verlängern. Glücklicherweise scheint das Altern veränderbar zu sein, und Strategien wie Bewegung und Ernährung zeigen vielversprechende Ergebnisse bei der Bekämpfung des Alterns. Diese Strategien reichen jedoch nicht aus, um den Alterungsprozess zu verlangsamen, und es werden Maßnahmen benötigt, die weniger komplex und einfacher umzusetzen sind. Ein wichtiges Thema in diesem Zusammenhang ist die Entwicklung von Arzneimitteln und Naturprodukten mit Anti-Aging-Wirkung, die ohne Nebenwirkungen täglich angewendet werden können. Ein gutes Beispiel für solche natürlichen Produkte sind marine Arten, die viele bioaktive Verbindungen mit nützlichen biologischen Aktivitäten enthalten. Sie wurden in der Arzneimittelforschung zur Bekämpfung verschiedener Krankheiten eingesetzt; ihr Potenzial als Anti-Aging-Mittel wurde jedoch übersehen. In der vorliegenden Studie habe ich die geroprotektiven Wirkungen der marinen Braunalge *Eisenia bicyclis* und der Halophytenpflanze *Salicornia europaea* untersucht. Ich entdeckte, dass wässrige Extrakte dieser Arten die Lebensspanne von *Drosophila melanogaster* geschlechtsspezifisch und nicht stammspezifisch verlängern. Beide Extrakte beeinflussten den Stoffwechsel der Fliegen, indem sie den Glukose- und TAG-Spiegel veränderten. Ich konnte zeigen, dass die Fliegen, die mit *Eisenia bicyclis*-Extrakt gefüttert wurden, keine negativen Auswirkungen einer zucker- und fettreichen Diät auf die Lebensspanne mehr zeigten, wobei die Auswirkungen bei zuckerreicher Diät größer waren, was auf antidiabetische Wirkungen des Extrakts hindeutet. Interessanterweise war die späte Verabreichung des *Eisenia bicyclis*-Extrakts bei einer zuckerreichen Diät von Vorteil. Der Extrakt aus *Salicornia europaea* hingegen wirkte sich positiv auf eine fettreiche Diät aus, nicht aber auf eine zuckerreiche Diät, was die lipidsenkende Wirkung des Extrakts verdeutlicht. Diese Fliegen reagierten empfindlicher auf Hungerstress. Ich fand heraus, dass die miteinander verwobenen Insulin/Insulin-ähnlichen und Tor-Signalwege erforderlich sind, um die Lebensspanne der Fliegen zu verlängern, da die

Veränderung dieser Signalwege in den Fliegen dazu führte, dass die vorteilhaften Wirkungen von *Eisenia bicyclis* beeinträchtigt wurden. Darüber hinaus regulierte der Extrakt die Expression des lebensverlängernden Gens Sirtuin 6 hoch. *Salicornia europaea*-Extrakt verlängerte jedoch nicht die Lebensspanne von Tor-Mutanten, während er die Lebensspanne von Tieren mit FoxO-Mangel positiv beeinflusste. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Salicornia europaea* hauptsächlich den Tor-Signalweg modifiziert. Ich habe auch gezeigt, dass der RNAi-Knockdown des nachgeschalteten Tor-Effektors S6-Kinase im Fettkörper die lebensverlängernde Wirkung von *Eisenia bicyclis* aufhob, während diese Manipulation in den Enterozyten und Skelettmuskelzellen die positive Wirkung des Extrakts nicht blockierte. Das deutet darauf hin, dass das fettspeichernde Organ das Zielorgan des *Eisenia bicyclis*-Extrakts ist. In ähnlicher Weise wurde durch die Manipulation der Tor-Signalübertragung im Fettkörper durch die Aktivierung von *Tor^{DN}* in diesem fettspeichernden Organ die Verlängerung der Lebensspanne von Fliegen, die mit *Salicornia europaea*-Extrakt gefüttert wurden, aufgehoben. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass Enterozyten, intestinale Stammzellen (ISCs) und Enteroblasten keine Ziele des Extrakts sind. Ich fand heraus, dass eine dreiwöchige Behandlung mit dem *Salicornia europaea*-Extrakt die Expression von *impl2*, *foxo* und *glut1* herunterreguliert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Eisenia bicyclis* und *Salicornia europaea* zwei Arten mit bioaktiven Verbindungen sind, die als gesundheitsfördernde Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden