

**Role of mitochondria and metabolism in
insulin/IGF-like signaling-mediated lifespan
extension in *Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Chirag Jain

Aus Indore, Indien

Köln, 2017

Gutachter: **Prof. Dr. Linda Partridge**

Prof. Dr. Aleksandra Trifunovic

Tag der mündlichen Prüfung: January 26, 2017

ZUSAMMENFASSUNG

Eine reduzierte Aktivität des hoch konservierten Insulin-/Insulinähnlichen Wachstumsfaktor-Signalwegs (IIS) kann die gesunde Lebenserwartung in Nematoden, Fruchtfliegen und Mäusen verlängern. In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* führt die Herunterregulierung der IIS-Aktivität nicht nur zu einer erhöhten Lebensdauer, sondern auch zu mehreren anderen Phänotypen wie verzögerter Entwicklung, Zwergwüchsigkeit, reduzierter Fekundität, Änderungen in der Energiespeicherung und erhöhter Stressresistenz. Daher stellt es eine große Herausforderung dar, die Gene und Signalwege zu identifizieren, welche den Effekten von reduziertem IIS auf die Lebensdauer im Gegensatz zu den vielen anderen Effekten zugrunde liegen. Zudem treten die Effekte eines reduzierten IIS vermutlich gewebespezifisch auf und beinhalten eine systemische Kommunikation zwischen verschiedenen Geweben. Um die Mediatoren des IIS und der Regulierung der Lebensdauer zu identifizieren, wurde zuvor ein unvoreingenommener, gewebespezifischer Proteomik-Screen in unserem Labor durchgeführt. Interessanterweise wurden dabei zwei Prozesse hervorgehoben, welche eine wichtige, gewebespezifische Rolle in IIS-vermittelter Verlängerung der Lebensdauer spielen: mitochondriale Respiration und Methionin-Metabolismus. Daher sind die IIS-vermittelte Regulierung der mitochondrialen Elektronentransportkette (ETK) und der Glycin-N-Methyltransferase (GNMT) mit ihrer Rolle im Methionin-Metabolismus das Hauptaugenmerk meiner Doktorarbeit.

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit habe ich die Rolle von Mitochondrien in der IIS-vermittelten Verlängerung der Lebensdauer in dem Modellorganismus *Drosophila* untersucht. Zunächst habe ich mich auf die mitochondriale Respiration als Maß der mitochondrialen Funktion konzentriert und untersucht, wie sich die gewebespezifische Respiration mit dem Alter verändert. Diese Studie zeigt, dass die mitochondriale Respiration im Thorax und Darm von Wildtyp-Fliegen mit dem Alter abnimmt, nicht aber im Fettkörper oder Kopf. Dies deutet darauf hin, dass -trotz eines generellen Trends zur Abnahme der mitochondrialen Funktion mit zunehmendem Alter- nicht alle Gewebe gleichermaßen vom Alterungsprozess betroffen sind. Die Proteomanalyse von IIS-Mutanten zeigt, dass eine Reduktion des systemischen IIS sich gewebespezifisch auswirkt; im Fettkörper wurden Proteine der ETK auf dFoxo-abhängige Weise hochreguliert, während andere Gewebe keine derartige Regulierung

aufwiesen. Interessanterweise zeigt unsere Studie, dass die mitochondriale Respiration im Fettkörper von langlebigen mNSCs-abladierten Fliegen erhöht war und dass dies dFoxo-abhängig war. Die erhöhte Respiration in diesen langlebigen Fliegen war auch mit erhöhter Mitochondrien-Biogenese assoziiert. Zusammengenommen weist dies darauf hin, dass die Erhöhung oder Erhaltung einer gesunden mitochondrialen Population in metabolisch aktivem Gewebe ausschlaggebend für eine gesündere und längere Lebensdauer ist, und dass dies der erhöhten IIS-vermittelten Lebensdauer zugrunde liegen könnte.

Darüber hinaus hat unsere Studie außerdem demonstriert, dass Fettkörper-spezifische Überexpression von Spargel/PGC-1a (einem Transkriptionsfaktor, welcher für mitochondriale Biogenese verantwortlich ist) ausreichend ist, um die Lebensdauer zu verlängern. Des Weiteren konnten wir bestätigen, dass die *Spargel/PGC-1a*- und *Delg/Nrf-2a*-abhängige mitochondriale Biogenese essentiell für die IIS-vermittelte Erhöhung der Respiration im Fettkörper und zumindest teilweise für IIS-vermittelte Langlebigkeit ist.

Im zweiten Teil der Studie habe ich die Rolle der Glycin-N-Methyltransferase (GNMT) in der IIS-vermittelten Langlebigkeit in *Drosophila* untersucht. Vor Kurzem wurde berichtet, dass eine Beschleunigung des SAM Katabolismus durch ubiquitäre GNMT-Überexpression die Lebensdauer von *Drosophila* erhöht. Jedoch ist es bis jetzt unbekannt, auf welche Weise die GNMT Level die Lebensdauer beeinflussen und in welchem Gewebe GNMT eine wichtige Rolle spielt. Zudem ist die Rolle von GNMT in IIS-vermittelter Langlebigkeit nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass GNMT eine wichtige Rolle in IIS-vermittelter Verlängerung der Lebensdauer spielt und sowohl notwendig als auch ausreichend ist, um die Lebensdauer zu erhöhen. Des Weiteren zeigen wir, dass der positive Effekt auf die Lebensdauer nicht auf erhöhte TSP-Aktivität oder erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress zurückzuführen ist. Interessanterweise erhöht die Behandlung mit Spermidin die Lebensdauer von Wildtyp Fliegen. Die Studie zeigt außerdem, dass IIS Mutanten, denen GNMT fehlt, aber die mit Spermidin behandelt wurden, eine mit unbehandelten IIS-Mutanten vergleichbare Lebensdauer haben. Dies weist darauf hin, dass Spermidin verantwortlich für die IIS-vermittelte Erhöhung der Lebensdauer via GNMT ist. Unsere Analyse deutet schließlich darauf hin, dass die Verbindung zwischen GNMT Levels und Langlebigkeit evolutionär konserviert zu sein scheint.

SUMMARY

Reduced activity of the highly evolutionary conserved insulin/insulin-like growth factor signaling (IIS) pathway can extend healthy lifespan in nematode worms, fruit flies and mice. In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, down-regulation of IIS activity results not only in increased lifespan, but also several other phenotypes including delayed development, dwarfism, reduced fecundity, changes in energy storage and increased stress resistance. Thus, a major challenge is to identify the genes and pathways that underlie the effects of reduced IIS on lifespan as opposed to its many other pleiotropic effects. Additionally, the effects of reduced IIS are likely to be tissue-specific, and to involve systemic communication between different tissues. To identify the mediators of IIS and lifespan regulation, an unbiased tissue-specific proteomics screen was performed previously in the lab. Interestingly, two processes, mitochondrial respiration and methionine metabolism, were highlighted as playing an important, tissue-specific role in IIS-mediated longevity. As such, IIS-mediated regulation of the mitochondrial ETC (Electron Transport Chain), and GNMT (Glycine N-methyl transferase) with its role in methionine metabolism are the focus of my Ph.D. thesis.

In the first part of this thesis, I have analyzed the role of mitochondria in IIS-mediated lifespan extension using *Drosophila* as a model organism. At first, I focused on mitochondrial respiration as a proxy for mitochondrial function and investigated how tissue-specific respiration changes with age. This study shows that mitochondrial respiration declines with age in the thorax and the gut of wild type flies, however, this did not occur in the fat body or the head. This suggests that although a general trend in declining mitochondrial function is associated with ageing, the mitochondria of individual tissues do not all respond to age in the same way. Proteomic analysis of IIS-mutants shows that reducing systemic IIS results in tissue-specific responses; the fat body responded by up-regulating mitochondrial ETC proteins, and that this regulation was dfoxo-dependent, whilst other tissues showed no such regulation. Interestingly, our study shows that mitochondrial respiration was increased in the fat body of long-lived mNSCs-ablated flies, and that this increase was dfoxo-dependent. The increased respiration in these long-lived flies was also associated to increased mitochondrial biogenesis. Together, this suggests that increasing, or maintaining, a healthy mitochondrial population within metabolically active tissue is crucial for a

healthier and longer lifespan, and may underlie the increased longevity of IIS. Expanding on this, our study also demonstrated that fat body specific over expression of *spargel/PGC-1 α* (a transcription cofactor responsible for mitochondrial biogenesis) was sufficient to extend lifespan. Furthermore, we confirmed that mitochondrial biogenesis, through *spargel/PGC-1 α* and *delg/Nrf-2 α* is necessary for the IIS-mediated increase in fat body respiration and at least partially IIS-mediated longevity.

In the second part of the study, I analyzed the role of GNMT (Glycine N-methyl transferase) in IIS-mediated longevity in *Drosophila*. Recently, it has been suggested that enhancing SAM catabolism by ubiquitous *Gnmt*-over-expression extends lifespan in *Drosophila*. However, how GNMT level influences lifespan, and in which tissue, GNMT plays a role remains unknown. Furthermore, the role of GNMT in IIS-mediated longevity remains elusive. The present study shows that GNMT plays a major role in IIS-mediated lifespan extension, being both necessary and sufficient to extend lifespan. Furthermore, we shows that the lifespan extending effect is not due to either increased TSP activity or increased oxidative stress resistance. Interestingly, spermidine treatment extends the life span of wild type flies. The study also shows that IIS mutants lacking GNMT, but treated with spermidine, live as long as untreated IIS mutants, suggesting that spermidine is responsible for IIS-mediated lifespan extension via GNMT. Finally, our analysis in long-lived mouse models suggests the link between GNMT levels and longevity might be evolutionarily conserved.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Fau Prof. Dr. Linda Partridge betreut worden.

Köln, Germany
November 2016

Chirag Jain

CURRICULUM VITAE

Chirag Jain

Max Planck Institut für Biologie des Alterns
Joseph Stalzmänn Str. 9b, Köln, Deutschland
Telefon: +49 1634890270, Email: chirag.jain@age.mpg.de
<https://www.linkedin.com/in/chirag-jain>



AUSBILDUNG

Ph.D. Biochemie/Molekulare Genetik August 2013- January 2017
Max Planck Institut für Biologie des Alterns, Köln, Deutschland
Title der dissertation: "Role of mitochondria and metabolism in insulin/IGF-like signaling-mediated lifespan extension in *Drosophila melanogaster*."
Supervisor: Prof. Dr. Linda Partridge

M.Tech. Molekularbiologie und Humangenetik Juli 2008- Juni 2011
Bharathiar Universität, Coimbatore, Indien
Title der Masterarbeit: "Cloning, overexpression, purification and crystallization of a protein from Mycobacterium tuberculosis, involved in histidine biosynthetic pathway."
Supervisor: Dr. Bichitra Biswal, NII, Neu Delhi, Indien

B.Sc. Biotechnologie Juli 2005- Juni 2008
D.A.V.V. Universität, Indore, Indien
Title des Projekts: "Screening of TGFβ gene for mutation/polymorphism in cleft lip and palate patients and their matched controls."
Supervisor: Prof. Dr. Rajiva Raman, BHU, Banaras, Indien

CHIRAG JAIN
