

DISS. ETH NO.25047

Novel Genetic Modulators Regulate Healthspan by Altering Proteostasis

A dissertation submitted to
Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zürich

For the degree of
Doctor of Sciences of ETH Zürich
(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

Meenakshi RAVICHANDRAN

Master of Science in Biology
ETH Zurich

Born March 30th, 1990
Citizen of India

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael RISTOW
Prof. Dr. Christian WOLFRUM
Prof. Dr. Jan KRÜTZFELDT

2018

Summary

Aging is the progressive decline of physiological function with time. It is a major risk factor for number of diseases including neurodegenerative, metabolic and cardiovascular diseases in humans. However, studies in various invertebrate and vertebrate model systems indicate the plasticity of aging process and that it is amenable to modulation. Furthermore, there is a conservation of various signaling pathways regulating healthspan across diverse organisms.

In this thesis, we used a trans-species approach using either three species (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Mus musculus*, part 1), or four different species (*C. elegans*, *D. rerio*, *M. musculus*, *Nothobranchius furzeri*, part 2) to analyse aging-associated changes in the expression pattern of conserved genes across these organisms. Specifically, I have aimed to characterize and understand the downstream mechanisms of action of the consistently regulated genes with strong effect on lifespan of *C. elegans*. This nematode is a popular model system for studying aging as it offers a number of advantages including short lifespan, ease of genetic manipulation, and conservation of a number of important mammalian pathways.

In the first part of this thesis, I studied the second most prominent candidate gene from the three species screen, *gcat/T25B9.1* (orthologue of glycine-C-acetyltransferase, *GCAT*, EC 2.3.1.29). Its impairment through post developmentally applied RNA interference (RNAi) extends the mean lifespan by ~22% with a concomitant improvement in healthspan related parameters. This gene interferes with threonine catabolism and promotes the formation of methylglyoxal (MGO, CAS 78-98-8) in an amine oxidase-dependent manner. MGO is a known α -dicarbonyl compound inducing diabetic complications in mammals by causing oxidative stress and damage to cellular components, including proteins and DNA, through the formation of advanced glycation end products (AGEs). In our study, I observed a non-linear (“hormetic”) response of MGO, whereby low-dose MGO promotes lifespan extension, whereas higher concentrations of MGO exerts toxicity and concomitant lifespan shortening in nematodes. Both *gcat/T25B9.1* RNAi and the exogenous application of low dose MGO extend

lifespan dependent on the stress-responsive transcription factors SKN-1 and HSF-1. The ubiquitin-proteasome pathway (UPS) serves as one of the main mechanisms for the degradation of glycated proteins and is regulated by both SKN-1 and HSF-1. Indeed, I observed an upregulation of subunits of UPS, namely of the PBS-3 and RPN-6.1 upon *gcat/T25B9.1* impairment, and a simultaneous increase in the proteolytic activity of the proteasome as a response to stress. Hence, *gcat* acts as an evolutionary conserved aging-related gene that orchestrates a non-linear impact of proteotoxic MGO on longevity in *C. elegans*.

In the second experimental part, we extended the previous three species approach with an analogues study including an additional species namely the killifish *N. furzeri*, a short-lived vertebrate that can be raised in captivity. Out of evolutionary conserved and similarly aging-regulated 45 genes detected within this screen, we observe the most robust extension of *C. elegans* lifespan upon impairing *las1//Y6B3B.9* (orthologue of LAS1 like, *LAS1L*). Knockdown of this gene by RNAi improves healthspan parameters, impairs ribosomal biogenesis, and downregulates the 60S subunit of ribosomes in nematodes. Consequently, I observed a reduction in global protein turnover. The lifespan extension upon *las1//Y6B3B.9* knockdown is dependent on Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway and activation of AAK-2, the regulatory subunit of AMPK. Moreover, I observed a dramatic change in the transcriptional profile and a potential regulation of chromatin structure upon impairment of *las1//Y6B3B.9*. Further studies are required to test whether this is an active regulation of gene expression through histone modifications, and to identify the key downstream effectors of the healthspan extension.

In the last part of the thesis, we briefly review the experimental evidence supporting lifespan extension upon impairing glucose catabolism, and potential pharmacological approaches to mimic low-carbohydrate diet in light of the recent findings from “Prospective Urban Rural Epidemiology” (PURE) link study.

Taken together, our studies uncovered novel mechanisms of genetic regulation of aging. The results suggest that shifting the balance of protein homeostasis by either increasing the quality control through the proteasome machinery or by impairing translation load benefits healthspan. These concepts

open avenues for future studies in mammalian systems to verify the conservation of these pathways, to establish novel anti-aging targets, and to ultimately improve human healthspan.

Zusammenfassung

Altern ist definiert als das fortschreitende Nachlassen der physiologischen Funktionen mit der Zeit. Es ist Hauptrisikofaktor einer Reihe von Krankheiten, einschließlich neurodegenerativer, metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen. Studien in verschiedenen Modellorganismen weisen auf eine Plastizität des Alterungsprozesses hin und haben zudem gezeigt, dass dieser modifizierbar ist. Darüber hinaus sind viele Signalwege, die einen gesunden Alterungsprozess regulieren, über verschiedene Organismen hinweg konserviert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein artenübergreifender Ansatz verfolgt, um einheitlich regulierte Gene über verschiedene Organismen hinweg zu vergleichen. Diese Gegenüberstellung wurde einmal mit drei Arten (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Mus musculus*, Teil 1) und einmal mit vier Arten (*C. elegans*, *D. rerio*, *M. musculus*, *Nothobranchius furzeri*, Teil 2) durchgeführt. Im Speziellen haben wir Gene charakterisiert, die einen relevanten Einfluss auf die Lebensspanne eines Organismus ausüben können. Ziel dieser Arbeit war es, diese Wirkungsmechanismen dieser Gene zu verstehen und zu charakterisieren. Der Nematode *C. elegans* ist ein beliebtes Modell und das eine Vielzahl von Vorteilen bietet, einschließlich einer kurzen Lebensdauer, der Möglichkeit einfacher genetischer Manipulation und das Vorhandensein wichtiger Signalwege, die auch in Säugetieren aktiv sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Gen *gcat/T25B9.1* charakterisiert. Es zeigte beim Vergleich der drei Arten die zweitstärkste Zunahme der Lebenserwartung und wurde deshalb für die Charakterisierung ausgewählt. Die Beeinträchtigung durch RNA-Interferenz (RNAi) nach der Entwicklungsphase von *C. elegans* verlängert die mittlere Lebensdauer um ~ 22% bei einer gleichzeitigen Verbesserung verschiedener Gesundheitsparameter. *gcat/T25B9.1* beeinflusst den Abbau der Aminosäure Threonin, und fördert hierdurch die Bildung von Methylglyoxal (MGO, CAS 78-98-8). MGO ist eine α -Dicarbonylverbindung, die diabetesbedingte Komplikationen im Menschen auslöst, indem sie oxidativen Stress und Schäden an zellulären Komponenten, einschließlich Proteinen und DNA, durch die Bildung von "advanced glycation end products" (AGEs) verursacht.

In unserer Studie konnte eine nichtlineare ("hormetische") Antwort auf MGO beobachtet werden: Während niedrig dosiertes MGO die Lebensdauer förderte und in der Wirkung der Herunterregulierung von *gcat*/T25B9.1 ähnelte, zeigten hohe MGO-Konzentrationen eine toxische Wirkung auf *C. elegans*. Die schützende MGO-abhängige Antwort, die zu einer verlängerten Lebensspanne führt, wird von den Stress-regulierten Transkriptionsfaktoren SKN-1/NRF2 und HSF-1 vermittelt. Zusätzlich konnte eine Hochregulierung von Untereinheiten des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS), namentlich PBS-3- und RPN-6.1, und eine gleichzeitige Erhöhung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms als Antwort auf diesen Carbonyl-Stress beobachtet werden. Zusammenfassend agiert *gcat* als ein evolutionär konserviertes, mit dem Altern assoziiertes Gen, welches eine unerwartete, nichtlineare Wirkung von proteotoxischem MGO auf die Langlebigkeit koordiniert.

Im zweiten experimentellen Teil wurde der vorherige Ansatz durch die Berücksichtigung einer vierten Spezies, dem Killifisch (*N. furzeri*), erweitert. Dieser ist ein kurzlebiges Wirbeltier, das in Gefangenschaft aufgezogen werden kann. Von den 45 Genen, die innerhalb dieses zweiten Screenings identifiziert wurden, wurde die robusteste Verlängerung der Lebensspanne in *C. elegans* für *las1*//Y6B3B.9 beobachtet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung dieses Gens durch RNAi die ribosomale Biogenese beeinträchtigt, und die 60S Untereinheit von Ribosomen in Nematoden herunterreguliert. Damit übereinstimmend wurde eine Verringerung des globalen Proteinumsatzes beobachtet. Weiterhin wurde gezeigt, dass die beobachtete Lebensverlängerung abhängig vom TOR-Signalweg und der Aktivierung von AAK-2, der regulatorischen Untereinheit der AMPK, ist. Darüber wurde eine dramatische Veränderung des Transkriptionsprofils und eine mögliche Regulation der Chromatinstruktur bei Beeinträchtigung von *las1*//Y6B3B.9 festgestellt. Weiterführende Studien sind erforderlich und in Bearbeitung, um aufzuklären, ob es eine aktive Regulation der Genexpression bei *las1*//Y6B3B.9-Beeinträchtigung und den wichtigsten Effektoren des Phänotyps gibt.

Im letzten Teil der Arbeit werden kurz die experimentellen Befunde, die für eine Verlängerung der Lebensspanne aufgrund einer Hemmung der Glykolyse sprechen, beleuchtet, sowie mögliche pharmakologische Ansätze zur Imitation

kohlenhydratarmer Kost diskutiert. Hierbei wird speziell auf die jüngsten Ergebnisse der sogenannten PURE-Studie (eengl. "Prospective Urban Rural Epidemiology") Bezug genommen.

Zusammengefasst konnten unsere Studien einen neuen Mechanismus, durch den genetische Regulatoren das Altern modulieren, aufdecken. Des Weiteren werden Vorgehensweisen aufgezeigt, die das Gleichgewicht der Proteinhomöostase zugunsten eines verbesserten Gesundheitszustandes verlagern können, indem entweder die Qualitätskontrolle durch die Proteasom-Maschinerie erhöht oder die Translationslast verringert wird. Diese neuartigen Konzepte eröffnen unerwartete Möglichkeiten für zukünftige Studien in Säugetiersystemen, um die Konservierung solcher Signalwege zwischen Arten zu verifizieren, neue Anti-Aging Ansatzpunkte zu etablieren und letztlich die menschliche Gesundheit zu verbessern.