

DISS. ETH NO. 29045

Novel insights into transcription factor-
mediated extension of lifespan: Molecular
pathways and pharmacological interventions

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

CHRISTOPH BENNER

M.Sc. Experimental and Clinical Neurosciences, Universität Regensburg

Born on 07.08.1991

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Michael Ristow

Prof. Dr. Katrien De Bock

2023

1. Summary

Biologically, aging can be defined as time-dependent decline in organ functions and increase in probability of death, notably after the organism has achieved its maximum reproductive competence. This aging phenotype is at least in part result of an individual's specific genes being expressed through transcription and translation at specific time points throughout life. Depending on a gene's epigenetic state, a group of gene regulatory proteins called transcription factors (TFs) play critical roles in controlling the rates of transcription of these genes by directly interacting with regulatory sequences at gene promoters.

Molecular and genetic studies have already identified several TFs whose activities are altered during aging, however, the picture of transcriptional regulation of aging is still incompletely understood and evolutionary conserved mechanisms needed to fill that gap.

To complement the still largely unknown contribution of TFs on aging, I present my PhD thesis as a composition of 4 independent projects at different stages of publication:

The first part of my PhD thesis is comprised of a published review on the role of TFs as geroprotectors. The current literature on the known age-regulating TFs is summarized and its underlying mechanisms with regards to its downstream cellular pathways portrayed in detail. Emphasis is put on potential evolutionary conserved TFs that might be subjected to pharmacological manipulation, extrapolating to potential starting points for clinical studies.

One such potentially pharmacologically manipulatable TF that confers an extension of health-and lifespan upon knockdown via RNAi is presented in the next part, the main project, of the thesis. A novel method of a DNA- pulldown assay using age-related synthetic promoter elements as baits was first developed to identify TFs that bind to these baits. 6 TFs were identified as candidates whose orthologs in *C. elegans* were not related to aging. We found the largest lifespan extending effect upon RNAi of *hlh-11* (*TFAP4* in humans), mediating this effect via upregulation of autophagy-mediated lipolysis (lipophagy) and its transcriptional regulator HLH-30 (TFEB in humans). We further conducted a compound screening with 1,400 compounds and found 2 compounds that were able to activate TFEB and increase autophagic flux in cells as well as increase lifespan and autophagic markers in *C. elegans*. Furthermore, these 2 compounds, evodiamine and corylifol A, were found to increase nematodal lifespan dependent on *hlh-11* and *hlh-30*. Correlation analysis could finally also demonstrate a possible evolutionary conserved role of *Tfap4/TFAP4* expression to murine and human lifespan.

In the next project, I provide my contribution to a synthetic biology project showing that feeding a nuclease dead Cas9 (dCas9)-expressing transgenic *C. elegans* strain with sgRNAs to promoters of genes *hif-1* and *hsf-1* increases both the expression of these genes as well as nematodal lifespan. This proof-of-principle study provides a novel technique to employ a gene-specific artificial TF machinery.

In the last part of my PhD thesis, I investigated the effect of the dissociative anesthetic ketamine on *C. elegans* lifespan. Mild perturbations in mitochondrial function have been shown to increase lifespan in various model organisms, a phenomenon called mitohormesis. Building upon a publication from the early 1980s showing that ketamine affects mitochondrial respiration via inhibition of mitochondrial electron transport chain (ETC) complex I, we conceptually extrapolated and experimentally verified that ketamine extends lifespan in a mitohormetic fashion. In more detail, ketamine transiently increases ROS that ultimately leads to a transient increase of the antioxidant defense system, amongst others shown via the inactivity of ketamine to extend lifespan on nematodal mutants for the gene encoding transcription factor SKN-1. We also showed that the lifespan-extending effect of ketamine is mediated by the innate immune system and subsequently conferring increased pathogen resistance, in summary paving the ground for follow-up studies on the effect of ketamine in inflammation-mediated aging.

2. Zusammenfassung

Biologisch gesehen kann das Altern als zeitabhängiger Rückgang der Organfunktionen und als Zunahme der Sterblichkeit definiert werden, insbesondere nachdem der Organismus seine maximale Reproduktionsfähigkeit erreicht hat. Dieser Alterungsphänotyp ist das Ergebnis der Expression spezifischer Gene eines Individuums durch Transkription und Translation zu bestimmten Zeitpunkten im Leben. Je nach dem epigenetischen Zustand eines Gens spielt eine Gruppe von Genregulationsproteinen, die so genannten Transkriptionsfaktoren (TFs), eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Transkriptionsraten dieser spezifischen Gene, indem sie direkt mit den regulatorischen Sequenzen an den Genpromotoren interagieren.

Molekularbiologische und genetische Studien haben bereits mehrere TFs identifiziert, deren Aktivitäten während des Alterns verändert sind. Das Bild der altersabhängigen Genregulierung ist immer noch ein unvollständiges Mosaik, und es bedarf evolutionär konservierter Mechanismen, um diese Wissenslücke zu schließen.

Um den noch weitgehend unbekanntem ganzheitlichen Beitrag der TFs zum Altern zu ergänzen, stelle ich meine Doktorarbeit als ein Gesamtwerk aus 4 unabhängig voneinander eingereichten und/ oder veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten vor:

Der erste Teil meiner Doktorarbeit besteht aus einem veröffentlichten review über die Rolle von TFs im Alterungsprozess. Die aktuelle Literatur zu den bekannten altersregulierenden TFs wird zusammengefasst und die zugrundeliegenden Mechanismen in Bezug auf die nachgeschalteten zellulären Wege im Detail dargestellt. Der Schwerpunkt liegt auf potenziell evolutionär konservierten TFs, die pharmakologisch manipuliert werden könnten, was zu potenziellen Ansatzpunkten für klinische Studien führen könnte.

Ein solcher potenziell pharmakologisch manipulierbarer TF, der bei knockdown durch RNAi in *C. elegans* eine Verlängerung der Lebensspanne bewirkt, wird im nächsten Teil, dem Hauptprojekt, vorgestellt. Zunächst wurde eine Pulldown-Methode angewendet, bei dem altersbezogene synthetische Promotorelemente als sog. Bait verwendet wurden, um TFs zu identifizieren, die an diese Baits binden. Es wurden 6 TFs als Kandidaten identifiziert, deren Orthologe in *C. elegans* zum Zeitpunkt der Analyse nicht mit dem Altern in Verbindung gebracht worden waren. Den größten lebensverlängernden Effekt fanden wir nach RNAi von *hlh-11* (TFAP4 im Menschen), das diesen Effekt über die Hochregulierung der durch Autophagie vermittelten Lipolyse (Lipophagie) und seines Transkriptionsregulators HLH-30 (TFEB im Menschen) vermittelt. Wir führten weiterhin ein Substanzscreening mit 1400

Substanzen durch, und fanden zwei Verbindungen, die in der Lage waren, TFEB zu aktivieren und Autophagie in Zellen zu erhöhen sowie die Lebensspanne und Autophagie-Marker in *C. elegans* zu erhöhen. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass diese beiden Verbindungen, Evodiamin und Corylifol A, die Lebensspanne in Abhängigkeit von *hlh-11* und *hlh-30* erhöhen. Eine Korrelationsanalyse konnte schließlich auch eine mögliche evolutionär-konservierte Rolle der Tfp4/TFAP4-Expression für die Lebensspanne von Mäusen und Menschen aufzeigen.

Im nächsten Projekt leiste ich als Co-Autor einen Beitrag zu einem Projekt innerhalb der synthetischen Biologie, das zeigt, dass die Fütterung eines Cas9-dead (dCas9)-exprimierenden transgenen *C. elegans*-Stamms mit Bakterien, die sgRNAs exprimieren, die an den Promotoren der Gene *hif-1* und *hsf-1* sowohl die Expression dieser Gene als auch die Lebensspanne der Fadenwürmer erhöht.

Im letzten Teil meiner Doktorarbeit untersuchte ich die Wirkung des dissoziativen Anästhetikums Ketamin auf die Lebensspanne von *C. elegans*. Milde Störungen der Mitochondrienfunktion zeigt bei verschiedenen Modellorganismen eine Verlängerung der Lebensspanne. Ein Phänomen, das als Mitohormesis bezeichnet wird. Aufbauend auf einer Veröffentlichung aus den frühen 1980er Jahren, die zeigt, dass Ketamin die mitochondriale Atmung über eine Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette (ETC) beeinflusst, haben wir experimentell verifiziert, dass Ketamin die Lebensspanne auf mitohormetische Weise verlängert. Genauer gesagt, erhöht Ketamin vorübergehend die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was letztlich zu einer Steigerung des antioxidativen Abwehrsystems führt, unter anderem vermittelt durch den TF SKN-1.