

ZUSAMMENFASSUNG

Funktionsstörungen des humanen mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (hTau) und seine Akkumulation in intraneuronale Aggregate werden in vielen neurodegenerativen Erkrankungen, einschließlich der Alzheimererkrankung, beobachtet. Erst kürzlich wurde die reversible Lysin-Acetylierung als regulatorische Modifikation entdeckt, die möglicherweise eine Rolle in der Alzheimererkrankung spielt. In der Tat wurde acetyliertes hTau Protein in Gehirnen von Alzheimerpatienten entdeckt. Zudem belegen Studien, dass Mehrfach-Acetylierung des hTau-Proteins seine Aggregationsneigung *in vitro* modulieren kann. Jedoch ist bisher weitgehend unklar, inwiefern Acetylierung des hTau-Proteins auch seine Toxizität *in vivo* beeinflussen kann. Aus diesem Grund habe ich zwei *Drosophila*-Modelle entwickelt, um die *In-vivo*-Relevanz der hTau-Acetylierung zu untersuchen. Dazu habe ich zunächst transgene Fliegen generiert, um die Auswirkungen einer Acetylierung am Lysin 280 des hTau-Proteins zu untersuchen. Hierfür habe ich Mimikmutanten verwendet, die zum einen das acetylierte Lysin (K280→Q) und zum anderen das nicht-acetylierte Lysin (K280→R) nachahmen. Eine Überexpression der hTau-K280Q-Mutante im adulten Nervensystem resultierte in einer verstärkten Photorezeptordegeneration, einer gesteigerten Proteinstabilität und beeinflusste darüberhinaus das Phosphorylierungsmuster des hTau-Proteins. Außerdem waren diese Effekte mit funktionellen Beeinträchtigungen des Bewegungsapparates assoziiert. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Acetylierung von K280 ausreichend ist, um *in vivo* hTau bedingte Neurotoxizität zu induzieren, welche wiederum zu Neurodegeneration, funktionellen Beeinträchtigungen und erhöhter Proteinstabilität führt.

Im Zweiten Teil dieser Studie habe ich ein hTau-knock-in *Drosophila*-Modell generiert, das die Untersuchung von hTau assoziierter Toxizität unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. Tatsächlich ist die Expression des hTau-Proteins unter der Kontrolle des endogenen dTau-Promotors. Unter diesen endogenen Bedingungen war das Wildtyp-hTau-Protein stark phosphoryliert und die Phosphorylierung wurde darüber hinaus altersabhängig reguliert. Im weiteren Verlauf der Studie habe ich dieses neue endogene Modell genutzt, um den Einfluss von multipler Pseudoacetylierung des hTau-Proteins an Position K163, K280, K281 und K369 zu untersuchen. Die simultane Mutation dieser Lysine zu Glutamin (Q) führte zu sehr ausgeprägten Veränderungen des Phosphorylierungsmusters, wobei die meisten untersuchten Phosphorylierungsepitope in der hTau-4Q Mutante stark dephosphoryliert waren. Diese Effekte waren mit einer erhöhten Lebensspanne unter Standard- und unter Stressbedingungen assoziiert. Diese Mutationen gingen jedoch nicht mit einer offensichtlich veränderten Aggregationsneigung einher. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass multiple Acetylierung des hTau-Proteins einen günstigen Einfluss auf die Lebensspanne haben kann und ausreichend ist, um den Phosphorylierungsgrad des hTau-Proteins drastisch zu reduzieren.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einen starken regulatorischen Einfluss der Lysin-Acetylierung auf hTau bedingte Toxizität hin. Allerdings ist die Acetylierung *per se* nicht zwingend toxisch. Vielmehr scheint die Acetylierung des hTau Proteins eine von vielen anderen Komponenten zu sein, die im Stande ist, die Eigenschaften des Proteins zu beeinflussen. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, Acetylierung als einen Bestandteil zahlreicher regulatorischer Ereignisse zu betrachten, die sowohl die Funktion als auch die Toxizität des hTau-Proteins moduliert.

SUMMARY

Dysfunction and accumulation of the microtubule-associated human Tau (hTau) protein into intraneuronal aggregates is a phenomenon observed in numerous neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease (AD). Interestingly, reversible lysine acetylation has emerged recently as a posttranslational modification that may be involved in the modulation of hTau pathology. Indeed, acetylated hTau species have been identified within hTau aggregates in human AD brains and multi-acetylation of hTau has been shown to regulate its aggregation propensity in vitro. However, whether lysine acetylation directly modulates hTau-induced toxicity in vivo remains largely elusive. Therefore, I generated two new models of hTau pathology to investigate the in vivo relevance of hTau lysine acetylation.

First, I generated new transgenic *Drosophila* models of hTau pathology to evaluate the contribution of the single lysine 280 (K280) acetylation to hTau toxicity. Using pseudo-acetylated (K280→Q) and pseudo-unacetylated (K280→R) mutants of hTau I investigated the impact of pseudo-acetylation on hTau toxicity. Mis-expression of pseudo-acetylated hTau-K280Q in the adult fly nervous system exacerbated the loss of photoreceptor neurons, led to a higher stability of the hTau protein and further modulated hTau phosphorylation in fly heads. Moreover, these effects were associated with functional decline in the form of impaired locomotor ability when compared to the hTau-K280R mutant. Altogether, these results suggest that acetylation of K280 is sufficient to induce hTau neurotoxicity in vivo.

Second, I generated a powerful *Drosophila* model of hTau knock-in to evaluate toxicity associated with hTau under physiological conditions. Indeed, the knocked-in hTau was successfully expressed under the control of the endogenous dTau promoter allowing us to investigate hTau toxicity and function under endogenous conditions. Interestingly, hTau-wt was phosphorylated under these conditions and phosphorylation was moreover regulated in an age-dependent manner. Using this new model of hTau knock-in I further investigated the contribution of multi-site pseudo-acetylation at K163, K280, K281 and K369 to hTau-induced toxicity. Indeed, mimicking acetylation at 4 sites simultaneously had striking effects on the hTau phosphorylation pattern, as most of the investigated sites were drastically dephosphorylated. Moreover, these effects were associated with an increased median lifespan of the hTau-4Q knock-in line under standard and stress conditions. However, multi-site pseudo-acetylation did not result in overt alterations of hTau protein solubility. Altogether, these results suggest that acetylation at multiple sites can be beneficial reducing overall phosphorylation and increasing median survival and stress resistance in vivo.

Taken together, this study suggests a strong regulatory impact of acetylation on posttranslational modifications of hTau and on hTau-induced toxicity. However, acetylation per se does not necessarily lead to detrimental effects but rather is a building block, whose composition and interaction with other posttranslational modifications is crucial for the regulation of hTau-induced toxicity. Thus, it is important to consider acetylation as an important part among numerous regulatory events modulating hTau function and toxicity.