

8 Summary

The intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) depends on two highly polymorphic rhoptry proteins to achieve a virulent phenotype in mice. Avirulent strains of *T. gondii* are efficiently controlled by a family of atypical large GTPases, the interferon γ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins), in mice. Members of the IRG family localize to the parasitophorous vacuolar membrane (PVM) of the parasite. In case of avirulent parasites this leads to disruption of the PVM and subsequent death of *T. gondii* as well as the host cell. Virulent strains of *T. gondii* manage to overcome the IRG proteins. The virulent isoform of ROP18, an active member of a highly polymorphic family of kinases and pseudokinases, phosphorylates and thereby permanently inactivates mouse IRG proteins, preventing the parasite from death.

This study now demonstrates by biochemical and cell biological experiments that ROP18 is not able to inactivate the IRG system alone. The pseudokinase ROP5 has been shown in genetic crosses to be another polymorphic virulence determinant of *T. gondii* from the same family. Here it is shown that the virulent isoforms of ROP5 strongly enhance the phosphorylation of Irga6 by ROP18 most likely by exposing the target switch 1 threonines T102 and T108. Additionally ROP5 efficiently binds IRG proteins probably upon their relocalization to the PVM and traps them in their GDP bound inactive state. Thereby ROP5 prevents activation of the IRG proteins, which is needed for disruption of the PVM, presenting a ROP18 independent function in virulence.

The enhancement of ROP18 dependent phosphorylation by ROP5 is a new mechanism by which a pseudokinase assists a kinase, not by up regulating the kinases activity itself but by altering the conformation of its substrate protein preparing it for phosphorylation.

These results provide an explanation to the virulence phenotypes of the classical type I, type II and type III strains of *T. gondii* in mice. Only the virulent type I strains, but not type II and type III strains, carry the virulent alleles of both *rop5* and *rop18*.

9 Zusammenfassung

Der intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist von zwei hoch polymorphen Rhoptry Proteinen abhängig, um einen virulenten Phänotypen in Mäusen auszubilden. Avirulente Stämme von *T. gondii* werden in Mäusen effizient durch eine Familie von atypisch großen GTPasen, den so genannten Interferon γ induzierbare immunrelevante GTPasen (IRG Proteine) eingedämmt. Mitglieder der IRG Familie lokalisieren an der parasitophoren vacuolären Membran (PVM) des Parasiten. In avirulenten Stämmen führt dies zum Zerreißen der PVM und anschließenden Tod von *T. gondii* sowie der Wirtszelle. Virulente *T. gondii* Stämme sind in der Lage das IRG System zu überwinden. Die virulente Isoform von ROP18, einem aktiven Mitglied einer hoch polymorphen Familie von Kinasen und Pseudokinasen, phosphoryliert, und somit inaktiviert, die Maus IRG Proteine und schützt somit den Parasiten vor dem Tod.

Die vorliegende Studie demonstriert mit biochemischen und zellbiologischen Experimenten, dass ROP18 nicht alleine in der Lage dazu ist das IRG System zu inaktivieren. Die Pseudokinase ROP5, ein weiteres hoch polymorphes Mitglied der gleichen Familie, wurde durch genetische Kreuzungsexperimente als weiterer Virulenzfaktor von *T. gondii* identifiziert. Des Weiteren wird gezeigt, dass virulente Isoformen von ROP5 die Phosphorylierung von Irga6 durch ROP18 deutlich verstärkt, indem es die zu phosphorylierenden Threonine T102 und T108 in der „switch I“ Region besser zugänglich macht. Zusätzlich bindet ROP5 IRG Proteine, vermutlich wenn diese mit der PVM assoziieren, und hält diese so im inaktiven (GDP gebundenen) Zustand. Dadurch verhindert ROP5 die für das Aufreißen der PVM notwendige Aktivierung von IRG Proteinen und verfügt somit über eine zusätzliche, ROP18 unabhängige Virulenzfunktion.

Die Verstärkung der ROP18 abhängigen Phosphorylierung durch ROP5 ist ein neuer Mechanismus. Eine Pseudokinase verstärkt nicht die Kinaseaktivität der Kinase direkt, sondern indem es das Substrat leichter für die Kinase zugänglich macht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können die Virulenzunterschiede zwischen Typ I, Typ II und Typ III Stämmen von *T. gondii* in Mäusen erklären. Nur die virulenten Typ I Stämme verfügen über ein virulentes Allel von *rop5* und *rop18*, während Typ II und Typ III Stämme nicht über diese Kombination verfügen.