

Zusammenfassung

RpkA ist ein ungewöhnlicher G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR). Am Aminoterminus sind die GPCR charakteristischen sieben Transmembrandomänen lokalisiert, der Carboxyterminus besteht aus einer Phosphatidylinositol 4-Phosphat-5-Kinase (PI4P5K). RpkA wird an prä-lysosomalen, lysosomalen und post-lysosomalen Membranen beobachtet, jedoch nicht an der Plasmamembran. RpkA ist früh am neu entstandenen Phagosom (ab 73 sec) zu sehen, scheint jedoch nicht in die Bildung des Phagosoms involviert zu sein, da RpkA-GFP nicht an der sich bildenden phagozytischen Membran („phagocytic cup“) beobachtet wurde. *rpkA⁻* Zellen haben einen gestörten Phosphatidylinositolphosphat-Haushalt, da sie verringerte Level an Phosphatidylinositol(mono)phosphaten (PI3P, PI4P und oder PI5P) und Phosphatidylinositol(bis)phosphaten (PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂ und oder PI(4,5)P₂) zeigen. Weiterhin zeigen *rpkA⁻* Zellen eine erhöhte Anfälligkeit gegen Stickstoffmangel.

RpkA Ko Zellen zeigen eine verminderte Aufnahme von Hefe, auch die Phagozytose von *E. coli* scheint beeinträchtigt zu sein. Die Aufnahme von lebenden *L. pneumophila* ist hingegen unbeeinträchtigt. Allerdings ist die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* in *rpkA⁻* gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht.

Bei der Suche nach Interaktionspartnern wurden VatC und VatM sowie Rack1 (GpbB) als mögliche Interaktionspartner von RpkA identifiziert. VatC und VatM sind Untereinheiten der vakuolären H⁺-ATPase, die auf Organellen des endosomalen Transportweges sowie als Teil der kontraktile Vakuole in *D. discoideum* zu finden ist. Komponenten der vakuoläre H⁺-ATPase wurden auch in Co-Immunpräzipitationsexperimenten gefunden. Die vakuoläre H⁺-ATPase und RpkA-GFP zeigen darüber hinaus diskrete Co-Lokalisation.

Rack1 (GpbB) ist ein weiterer möglicher Partner von RpkA. GpbB ist ein bisher uncharakterisiertes Protein in *D. discoideum*. Hier konnte gezeigt werden, dass GpbB das Homolog von Rack1 ist. Rack1 steht für Receptor der aktivierten Protein C Kinase und interagiert mit PKC sowie vielen anderen Proteine wie Rezeptoren, dem IP3-abhängigen Ca⁺⁺- Kanal und dem Ribosom. Außerdem wurde es auf Phagosomen gefunden sowohl in *D. discoideum* als auch in Säugetierzellen. DdRack1 ist zytosolisch lokalisiert, zeigt sich jedoch auch im Nukleus und co-sedimentiert mit Membranen. Rack1 wird während der vegetativen Phase und

während der gesamten Entwicklung gleichmäßig exprimiert. Co-Immunpräzipitationen und GST-Präzipitationen zeigten, dass auch DdRack1 mit dem Ribosom und RNA-bindenden Proteinen interagieren kann. Näher untersucht wurde die direkte Interaktion von Rack1 mit $\mu 2$ der mittleren Kette des Adaptorkomplexes 2. Das wurde u. a. im Hefe-2-Hybrid System bestätigt. Diese Interaktion besteht auch im normalen Zellmilieu und Rack1 zeigt in Immunfluoreszenzen Co-Lokalisation mit AP2 an der Plasmamembran. Diese Interaktion wurde sowohl für *D. discoideum* als auch für Säugetierzellen bestätigt.

Summary:

RpkA is an unusual G-protein-coupled receptor. Its amino terminus shows the typical seven transmembrane domains and its carboxy terminus consists of a phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinase (PI4P5). RpkA localizes to pre-lysosomal, lysosomal and post-lysosomal membranes but not to the plasma membrane. RpkA is part of the early phagosome (from sec 73 on); whereas it seems not to be involved in the formation of the "phagocytic cup" as it could not be observed in this part of the membrane. An *rpkA*⁻ strain has a disturbed phosphatidylinositolphosphate balance since it shows reduced levels of phosphatidylinositol(mono)phosphate (PI3P, PI4P and or PI5P) and phosphatidylinositol(bis)phosphate (PI(3,4)P2, PI(3,5)P2 and or PI(4,5)P2). Additionally, *rpkA*⁻ shows a reduced tolerance against nitrogen starvation. *rpkA*⁻ cells show a reduction in yeast uptake, also phagocytosis of *E. coli* seems to be reduced. The uptake of living *L. pneumophila* is unaffected. However the intracellular replication rate of *L. pneumophila* is highly accelerated compared with the wildtyp.

VatC and VatM as well as Rack1 (GpbB) were identified as potential partners of interaction. VatC and VatM are subunits of the vacuolar H⁺-ATPase, which is a membrane component of the endosomal pathway as well as of the contractile vacuole in *D. discoideum*. Subunits of the vacuolar H⁺-ATPase were also identified in immuno-precipitations of RpkA-GFP. Moreover vacuolar H⁺-ATPase and RpkA-GFP show a distinct co-localisation.

The results suggest that RpkA is a component of endosomal membranes where it affects phagocytosis of various particles and where it might be a relevant factor for resistance against infection by pathogenic bacteria.

Rack1 (GpbB) is another potential partner of RpkA. GpbB was an uncharacterized protein of *D. discoideum*. Here it is shown that GpbB is a homologue of Rack1. Rack1 is the abbreviation of receptor of activated C kinase, as it interacts with activated PKC as well as with plenty of other proteins such as receptors, IP3-dependent Ca⁺⁺-channel and the ribosome. Furthermore it was found on phagosomes of *D. discoideum* and mammalian phagosomes. DdRack1 is mainly a cytosolic protein that is seen in the nucleus at times and co-sediments to some extent with the membrane fraction. The protein is expressed during the vegetative phase as well as during the developmental phase of *D. discoideum*. DdRack1 interacts with the ribosome and with mRNA-binding proteins as shown in co-immunoprecipitation as well as in GST-precipitation experiments.

An interaction of Rack1 with the medium chain (μ) of the adaptor complex 2 (AP2) was studied in detail. It appears to be specific and to occur in the normal cellular environment. The interaction of Rack1 with μ 2 was shown for the *D. discoideum* as well as for the mammalian proteins.