

SUMMARY

Vaccinia virus is a member of the pox virus family and replicates in the cytoplasm of infected cells. The intracellular enveloped form of vaccinia virus (IEV) uses an actin-based motility to facilitate cell-to-cell spread that is strikingly similar to the ones used by the intracellular bacterial pathogens *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri*. These pathogens polymerize actin at one pole of the bacterium. This actin polymerization leads to the formation of an actin 'comet' tail which propels the bacteria through the cytoplasm and from cell to cell. Studies on the actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* have provided interesting insights into the events that occur at the leading edges of motile cells where actin polymerization pushes the plasma membrane in a first step to achieve cell motility. In contrast to *Listeria* and *Shigella*, the molecules responsible for actin tail formation by vaccinia were unknown at the beginning of this thesis. A comparative immunolocalization study of cells infected with vaccinia, *Listeria* or *Shigella* showed that a tyrosine phosphorylated protein was present at the site of vaccinia actin tail formation, but was absent from tails induced by the bacteria. Infection with vaccinia virus resulted in a specific phosphorylation on tyrosine of four proteins. I showed that one of these phosphorylated proteins is the IEV specific protein A36R. The development of an infection-transfection assay allowed me to show that the tyrosines 112 and 132 of A36R are phosphorylated and that phosphorylation of tyrosine 112 is essential for actin tail formation. Using the same assay I was able to show that src family kinases phosphorylate A36R. This leads to the recruitment of the adaptor protein Nck and of N-WASP. N-WASP has been implicated in actin polymerization and in the actin-based motility of *Shigella*. However, the phosphorylation of the trans-membrane protein A36R and the recruitment of Nck were novel aspects in pathogen motility and lead to the suggestion that vaccinia mimics receptor tyrosine kinase signalling to achieve actin-based motility.

ZUSAMMENFASSUNG

Vaccinia Virus (VV) gehört zur Familie der Poxviridae und repliziert sich im Zellplasma infizierter Zellen. "Intracellular enveloped virions" (IEVs) von VV benutzen eine Aktin gestützte Motilität, um die Infektion von Zelle zu Zelle zu beschleunigen. Ähnliche Bewegungen werden von den intra-zellulären Bakterien *Listeria* und *Shigella* benutzt,. Diese Bakterien polymerisieren Aktin an einem Pol was zur Bildung eines Aktin-"Kometen"-Schweifs führt, der die Bakterien durch das Zellplasma und von einer Zelle zu benachbarten Zellen treibt. Untersuchungen der Aktin gestützten Fortbewegung von Bakterien haben interessante Einsichten in die Vorgänge an der Zellmembran mobiler Zellen geliefert. An der "leading edge" einer mobilen Zelle drückt polymerisierendes Aktin die Zellmembran nach aussen, was ein erster Schritt in der Bewegung der Zelle darstellt. Im Gegensatz zu *Listeria* und *Shigella* hatte man zu Beginn meiner Doktorarbeit noch keine Vorstellung welche Moleküle verantwortlich für die Bildung des VV Aktinschweifs sind sind. Eine vergleichende Immunlokalisations-Studie von VV, *Listeria* oder *Shigella* infizierten Zellen zeigte, daß ein phosphotyrosiniliertes Protein spezifisch nur an VV induzierten Aktinschweife lokalisiert. Eine Infektion mit VV resultierte in spezifischer Tyrosinphosphorylierung von vier Proteinen. Eines dieser Proteine ist das IEV spezifische Protein A36R. Die Entwicklung eines Infektions-Transfektions-Assays erlaubte es mir festzustellen, daß die Tyrosine 112 und 132 von A36R phosphoryliert werden und daß die Phosphorylierung von Tyrosin 112 entscheidend für die Bildung eines Aktinschweifs ist. Ich konnte weiterhin zeigen, daß Kinasen der Src Familie A36R phosphorylieren was zur Rekrutierung des Adaptorproteins Nck und von N-WASP führt. N-WASP spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktin gestützten Motilität von *Shigella*. Die Phosphorylierung des Membranproteins A36R und die Rekrutierung von Nck sind jedoch neue Aspekte im Gebiet der Aktin gestützten Motilität intrazellulärer Pathogene und führten zum Vorschlag, daß VV Transduktionswege von Rezeptortyrosinkinasen nachahmt um seine Aktin gestützte Motilität zu erreichen.