



Doctoral Thesis

RNAi screening for genes required for virus infection and endocytosis

Author(s):

Sacher, Raphael Christian

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006128880> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH N° 18793

RNAI SCREENING FOR GENES REQUIRED FOR VIRUS INFECTION AND ENDOCYTOSIS

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

RAPHAEL CHRISTIAN SACHER

Diplom Zoologe, University of Zurich

Born on March 8th, 1979

Citizen of Zuzgen AG

accepted on the recommendation of

Prof. Lucas Pelkmans, examiner

Prof. Urs Greber, co-examiner

Prof. Gisou van der Goot, co-examiner

2010

Summary

Small interfering RNA (siRNA) -mediated gene silencing has gained tremendous attention in the past years, and high throughput screening techniques in human tissue culture has paved the way for RNA interference (RNAi) to become an important systems biology data acquisition tool.

Despite the small size of their genomes, viral pathogens can reprogram cells to promote their replication by exploiting a multiplicity of cellular factors. One way of exploring the dependencies of a viral pathogen on the host cell is the systematic silencing of host genes by RNAi screening. Such screens do not only contribute to our knowledge of pathogenesis but also reveal much of the cell's functions by disclosing information about intracellular signaling pathways and higher structural protein organizations the virus might rely on for infection. Such an intracellular process and a preferred target for viral pathogens is the endocytic machinery, responsible for the uptake of molecules and transmission of signaling cues.

By studying the infection of 17 different viral pathogens, it was found that each of them has a specific infection pattern within the target cell population. This pattern was shown to be a reflection of the respective cellular state of a subpopulation of cells, which proves to be beneficial for the viral infection. It was also shown that the silencing of a single gene with siRNA can change the distribution of the subpopulations, and that this effect alone in turn can alter the overall infection levels of a cell population. As a consequence, it was concluded that this observation has to be taken into account to correctly interpret RNAi phenotypes. The findings of this study were further used to create a comparative functional infection profile of 17 different viruses on two different cell lines using a small siRNA library (50 kinases). Subsequent studies included the performance of five large-scale druggable genome RNAi screens to determine the functional requirements for the infection of Murine hepatitis virus, Simian virus 40, Vaccinia virus, Vesicular stomatitis virus and Yellow fever virus. Finally, the performance of a kinase screen to study the endocytosis of fluorescent transferrin has triggered intriguing hypotheses on the emergence of complex phenotypes in RNAi screens. This led to the establishment of a

6

supervised classification tool and the generation of concepts on how to successfully classify RNAi phenotypes.

Zusammenfassung

Small interfering RNA (siRNA)-vermitteltes Ausschalten von Genaktivität hat in den letzten Jahren enorm an Aufmerksamkeit gewonnen. Hochdurchsatz Screening-Methoden in menschlichen Zellkulturen haben der RNA-Interferenz (RNAi) zum entgeltlichen Durchbruch als wichtige Technik zur Datengenerierung in der Systembiologie verholfen.

Trotz der geringen Größe ihrer Genome haben virale Krankheitserreger unzählige Möglichkeiten eine Zelle umzuprogrammieren um dadurch ihre eigene Replikation zu fördern. Eine Möglichkeit, die Abhängigkeiten eines viralen Erregers von der Wirtszelle zu untersuchen, bietet sich durch das systematische Ausschalten der Wirtszellen-Gene mittels RNAi Screens. Solche Screens tragen nicht nur zu unserer Kenntnis der viralen Pathogenese bei, sondern liefern auch viele Erkenntnisse über die Funktion der Wirtszelle, in dem die Informationen über intrazelluläre Signalwege und höhere Proteinstrukturen, die der Virus für seine Infektion benötigt, offengelegt werden. Ein solcher Prozess, und bevorzugtes Ziel für virale Erreger ist die Endozytose, die für die Aufnahme von Molekülen und Übertragung von Signalen verantwortlich ist.

Durch das Studium der Infektion von 17 verschiedenen viralen Krankheitserregern wurde festgestellt, dass jeder von ihnen ein spezifisches Infektionsmuster innerhalb der Zellpopulation aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Muster den jeweiligen zellulären Zustand einer Subpopulation von Zellen widerspiegelt, der sich für die virale Infektion als Vorteil erweist. Es wurde auch gezeigt, dass das Ausschalten eines einzelnen Gens mit siRNA die Verteilung der Subpopulationen ändern kann, und dass alleine dieser Effekt die Gesamtinfektion einer Zellpopulation verändern kann. Als Folge wurde der Schluss gezogen, dass diese Beobachtung berücksichtigt werden muss, um RNAi Phänotypen korrekt zu interpretieren. Die Ergebnisse dieser Studie wurden weiter verwendet, um mit einer kleinen siRNA-Bibliothek (50 Kinasen) ein vergleichendes funktionelles Infektionsprofil von 17 verschiedenen Viren auf zwei verschiedenen Zell-Linien zu erstellen.

Nachfolgende Studien waren die Durchführung von fünf "druggable genome" RNAi-Screens (7000 gene), um die funktionelle Abhängigkeit des Maus Hepatitis Virus, Simian

8

Virus 40, Vaccinia-Virus, des Vesikulären Stomatitis Virus und des Gelbfieber-Virus zu bestimmen.

Ausserdem hat ein Screen über die Endozytose von fluoreszierendem Transferrin interessante Hypothesen über die Entstehung komplexer Phänotypen in RNAi-Screens ausgelöst, und führte unter anderem zur Programmierung einer Klassifizierungssoftware und zur Entstehung von Konzepten, wie RNAi Phänotypen erfolgreich klassifiziert werden können.