



Doctoral Thesis

## Membrane dynamics and membrane changes during virus entry

**Author(s):**

Bauer, Manuel Norbert

**Publication Date:**

2010

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006132778> →

**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 Nr. 18814

**Membrane dynamics and membrane changes  
during virus entry**

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

for the degree of

**Doctor of Sciences  
(Dr. sc. ETHZ)**

presented by

**Manuel Norbert Bauer**

Diplom Biologe Univ., Julius-Maximilians-Universität Würzburg

born on January 27<sup>th</sup>, 1980

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Lucas Pelkmans, examiner

Prof. Dr. Ruedi Aebersold, co-examiner

Prof. Dr. Patrick Meraldi, co-examiner

2010

## Summary

Caveolin-1 (Cav1), an integral membrane protein, is the major coat protein of caveolae and caveolar vesicles. The synthesis of Cav1 occurs at the membrane of the endoplasmic reticulum (ER), where the newly synthesized molecules are cotranslationally integrated in the ER membrane. After synthesis, but still in the ER, Cav1 forms oligomers, which are transported via the secretory pathway to the Golgi complex, where caveolar vesicles are formed. The exact molecular mechanism of how intact caveolar vesicles are assembled remains however unclear. Preliminary results from our lab showed, that the phosphomimetic mutant Cav1-S80D is unable to reach the plasma membrane and accumulates in a perinuclear area indicating an assembly defect. Using confocal microscopy I could show, that Cav1-S80D localizes to lipid droplets. Further I could show, that the phosphorylation at serine 80 is not required for targeting of caveolin-1 to lipid droplets, as the phosphodeletion mutant Cav1-S80A can also localise to these organelles when LD formation is induced by exogenous addition of oleic acid. As Cav1-S80D is unable to leave LDs, we asked whether Cav1-S80D can assemble into caveolar coats. I developed an image-based assay that allows the differentiation between Cav1 in its monomeric or oligomeric form and Cav1, which is assembled into intact caveolar coats. With this method I could show, that the phosphomimetic mutant Cav1-S80D does not assemble into intact caveolar coats. I was further able to show, using a phosphoserine-specific antibody, that serine-phosphorylation of Cav1 is increased in cells loaded with cholesterol or oleic acid. However, I could not unambiguously show, that S80 is indeed a phosphorylation site in Cav1 due to so far unsolved technical difficulties.

In a second project I investigated how viruses induce changes in the cell surface proteome and what consequences this has for intracellular signalling and infectious virus entry. In order to analyze this, we have, for the first time, combined a method that allows the selective isolation and identification of N-linked glycoproteins from the plasma membrane of intact living cells, with a targeted RNAi screen during the infectious entry of two mammalian viruses. We used Simian Virus 40 (SV40) and Vesicular Stomatitis Virus (VSV) as they have very different modes of entry and infection. We found that the cell surface was extensively remodelled within the first 45 min after virus exposure. We observed changes of an unexpected large number of

proteins with diverse functions ranging from cellular immunity, and cell adhesion, to mitogenic signalling. These changes were for the largest part virus-specific. We found that the extensive remodelling of the cell surface is functionally connected to complex intracellular signalling networks that control the infection process. We further analyzed a signalling module around EGF-receptor (EGFR), and show that, as expected from the quantitative proteomics and RNAi experiments, SV40 infection is suppressed, while VSV infection is stimulated upon EGFR signalling. Our results show that complex and widespread remodelling of the cell surface proteome during virus entry must be taken into account in our interpretation of the cellular systems involved in virus infection.

## Zusammenfassung

Caveolin-1 (Cav-1) ist ein integrales Membranprotein und das Hauptprotein, das den Mantel von Caveolae und caveolären Vesikeln bildet. Die Synthese von Caveolin-1 beginnt an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), wo neu synthetisierte Moleküle co-translational in die ER-Membran inseriert werden. Nach der Synthese formieren Cav-1 Moleküle Oligomere im ER, die über den sekretorischen Weg in den Golgikomplex transportiert werden, wo caveoläre Vesikel formiert werden. Der genaue molekulare Mechanismus, wie intakte caveoläre Vesikel zusammengesetzt werden, ist jedoch unbekannt. Vorläufige Resultate in unserem Labor zeigten, dass die phospho-mimetische Mutante Cav-1S80D die Plasmamembran nicht erreichen kann und stattdessen in einer perinukleären Region akkumuliert, was einen Defekt im Aufbau funktioneller caveolärer Einheiten impliziert. Mithilfe konfokaler Mikroskopie konnte ich zeigen, dass Cav-1S80D an Lipid Droplets lokalisiert. Des Weiteren konnte ich nachweisen, dass die Phosphorylierung an Serine 80 nicht für das Erreichen von Cav-1 an Lipid Droplets notwendig ist, da die Mutante, die nicht phosphoryliert werden kann (Cav-1S80A), ebenfalls an diesen Organellen lokalisiert, wenn die Formierung von Lipid Droplets durch exogene Gabe von Oleic Acid stimuliert wird. Da die Cav-1S80D-Mutante Lipid Droplets nicht verlassen kann, haben wir analysiert, ob Cav-1S80D in funktionelle Caveolae assemblieren kann. Ich habe ein bild-gestütztes Analyseverfahren entwickelt, das die Differenzierung zwischen Cav-1 in seiner monomeren oder oligomeren Form und Cav-1, das in intakte caveoläre Einheiten zusammengesetzt ist, erlaubt. Mit dieser Methode konnte ich zeigen, dass die phosphomimetische Mutante Cav-1S80D nicht in intakte caveoläre Einheiten assembliert. Des Weiteren konnte ich mithilfe eines Phosphoserin-spezifischen Antikörpers nachweisen, dass die Serin-Phosphorylierung an Cav-1 erhöht ist, wenn Zellen entweder mit Cholesterol oder mit Oleic acid beladen werden. Allerdings konnte ich aufgrund unlösbarer technischer Schwierigkeiten nicht unwiderruflich nachweisen, dass S80 in der Tat eine Phosphorylierungsstelle im Cav-1 Molekül ist.

In einem zweiten Projekt habe ich erforscht, wie Viren Veränderungen im Zelloberflächen-Proteom hervorrufen können und welche Konsequenzen diese für die intrazelluläre Signaltransduktion und die infektiöse Virusaufnahme in die Zelle haben.

Um dies analysieren zu können, haben wir zum ersten Mal eine Methode zur selektiven Isolierung und Identifikation von N-Glykan-gekoppelten Glycoproteinen der Plasmamembran lebender Zellen in Kombination mit einem gerichteten RNAi-Screen während der infektiösen Aufnahme zweier verschiedener Viren angewendet. Wir verwendeten Simian Virus 40 (SV40) and Vesicular Stomatitis Virus (VSV), da diese sich verschiedene Endozytose- und Infektionswege zunutze machen. Ich fand heraus, dass die Zelloberfläche innerhalb der ersten 45 Minuten nach Virusexposition einer starken Remodellierung unterworfen wird. Wir haben eine Veränderung einer unerwartet hohen Anzahl von Proteinen mit diversen Funktionen in zellulärer Immunität, Zelladhäsion und mitogener Signaltransduktion beobachtet. Diese Veränderungen waren grösstenteils virusspezifisch. Wir haben herausgefunden, dass die extensiven Veränderungen der Zelloberfläche funktionell mit komplexen intrazellulären Signaltransduktionsnetzwerken verbunden sind, die den Infektionsprozess kontrollieren. Des weiteren haben wir ein Signaltransduktionsmodul um den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor analysiert und zeigen hier, dass wie aufgrund der quantitativen Proteomics-Daten und RNAi-Experimente erwartet, SV40-Infektion durch Signale des EGF-Rezeptors unterdrückt wird, während VSV-Infektion stimuliert wird. Unsere Resultate zeigen, dass in der Interpretation der zellulären Systeme, die bei Virusinfektionen eine Rolle spielen, eine komplexe und weitläufige Remodellierung des Zelloberflächen-Proteoms während der Virusaufnahme berücksichtigt werden muss.