



Doctoral Thesis

## Systems biology of cell-to-cell variability in virus infection

**Author(s):**

Snijder, Berend

**Publication Date:**

2010

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006392146> →

**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 NO. 19249

# SYSTEMS BIOLOGY OF CELL-TO-CELL VARIABILITY IN VIRUS INFECTION

A dissertation submitted to

**ETH Zurich**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

presented by

**Berend Snijder**

MSc. Biomedical Sciences,  
University of Amsterdam

Born on August 31<sup>st</sup>, 1981

Citizen of The Netherlands

Accepted on the recommendation of

**Prof. Dr. Lucas L. Pelkmans**, examiner

**Prof. Dr. Ari Helenius**, co-examiner

**Prof. Dr. Jörg Stelling**, co-examiner

**2010**

## 1.1. Summary

Virus infection and replication critically depend on many host cellular processes that arise out of the complex interactions between hundreds of genes. Systematically interfering with host genes therefore offers an excellent opportunity for the identification of their role in virus infection.

In this thesis, the host dependencies of 17 different animal viruses have been studied. It was found that the infection efficiency of most viruses strongly and differentially depends on the host cellular microenvironment, revealing an unexpectedly large influence on cell-to-cell variability. In cell culture, the cellular microenvironment is primarily shaped by cell proliferation, leading to crowding and increased cell-cell contacts, hereafter referred to as the population context. Bayesian network structure learning on image-based measurements of unperturbed cells infected with Simian Virus 40 (SV40) identified causal factors underlying its population context-dependency. Specifically, SV40 infection depends on high plasma membrane levels of the sphingolipid GM1 and on cell-matrix adhesion signaling via Focal Adhesion Kinase (FAK) that both decrease with cellular crowding.

Next, RNA interference (RNAi) was employed to systematically reduce host gene expression levels and measure the effect on virus infection of all 17 viruses, in up to 4 different cell lines. Explicitly measuring and modeling the population context-determined effects on virus infection per perturbation significantly improved RNAi results in several ways. First, the population context was shown to be a strong confounding factor in cell population-averaged measurements of virus infection, which could be corrected for with newly developed methods. These corrected RNAi results led to a unique classification of the 17 viruses based on their host gene requirements. Second, several RNAi perturbations changed the population-context dependence of virus infection without significantly altering the overall levels of infection. These virus infection pattern-switches reveal the population context-specific regulation of individual host genes, and emphasize the active regulation underlying cell-to-cell variability of virus infection.

Finally, population context-determined FAK activity was shown to regulate cell surface levels of cholesterol and sphingolipids via the ABC transporter A1 (ABCA1). FAK suppresses ABCA1 transcription via the Phosphoinositide 3-kinase - Akt pathway and the transcription factor FoxO. High levels of ABCA1, observed in crowded populations of cells,

result in lower levels of cholesterol and sphingolipids, lower membrane lipid ordering, lysosomal targeting of sphingolipids, and impaired signaling to cellular spreading and to growth in size.

Taken together, this thesis offers new and systematic insights into the coordinated regulation of cellular homeostasis and its importance for virus infection.

## 1.2. Zusammenfassung

Virusinfektion und -replikation ist von vielen zellulären Prozessen des Wirts abhängig. Diese bestehen aus der komplexen Wechselwirkung von Hunderten von Genen. Systematische Manipulation von Wirtsgenen bietet daher eine ausgezeichnete Möglichkeit für die Identifizierung ihrer Rolle bei der Virusinfektion.

In dieser Arbeit wurden die Wirts-Abhängigkeiten von 17 verschiedenen Tier-Viren untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Effizienz der Infektion der meisten Viren stark von der Mikroumgebung der Wirtszelle abhängt. Dies offenbart einen unerwartet großen Einfluss auf die Zell-Zell-Variabilität. Die Mikroumgebung entsteht in erster Linie durch Zellwachstum, das eine Anhäufung der Zellen und vermehrte Zell-Zell-Kontakten zur Folge hat. Dieses Ereignis wird im Folgenden Populations-Kontext genannt. Mittels Strukturlernen Bayes'scher Netze von multi-parametrischen Messungen unmanipulierten Zellen, die mit Simian Virus 40 (SV40), einem doppelsträngigen DNA-Virus der Papova Virus-Familie infiziert wurden, konnten kausale Zusammenhänge des SV40 spezifischen Populations-Kontexts identifiziert werden. SV40-Infektion war spezifisch von hohen Mengen des Sphingolipids GM1 und Zell-Matrix-Adhäsion Signalisierung, vermittelt über die Fokal Adhesion Kinase (FAK), abhängig. Beides Faktoren, die vermindert in Regionen hoher Zelldichte auftreten.

Zum Einen wurde RNA-Interferenz (RNAi) eingesetzt, um systematisch die Expression einzelner Wirtspoteine zu reduzieren und deren Effekt auf die Infektion für alle 17 Viren zu messen. Besonders das Messen und Modellieren der, von den Populations-Kontext verursachten Effekte auf die Virusinfektion, verbesserte dabei die RNAi Ergebnisse in vielerlei Hinsicht. Zunächst zeigte sich, dass der Populations-Kontext eine sehr starker Störfaktor bei der gemittelten Messungen der Vireninfektion ist, dieser aber mit eigens entwickelten Methoden korrigiert werden kann. Diese korrigierten Ergebnisse ermöglichten eine einzigartige Klassifizierung der 17 Viren, basierend auf ihren Wirtsgenexpressionsanforderungen. Des weiteren wurde beobachtet, dass einige Manipulationen durch RNAi die Populations-Kontextabhängigkeit einiger Viren veränderten, ohne aber die Anzahl der infizierten Wirtszellen signifikant zu verändern. Diese Musteränderung der Vireninfektion verdeutlichen Populations-Kontext spezifische

regulation einzelner Wirtsgene, sowie deren aktive Regulierung, der die Zell-Zell-Variabilität der Vireninfection Zugrunde liegt.

Schließlich wurde gezeigt, dass die Populations-Kontext abhängige Aktivität von FAK die Menge an Cholesterol und Sphingolipiden über den ABC-transporter A1 (ABCA1) reguliert. FAK verringert hierbei die Transkription von ABCA1 über einen Phosphoinositid-3-Kinase, Akt und FoxO abhängigen Signalweg. Hohe Mengen von ABCA1, wie sie bei hoher Zelldichte vorkommen, führen zu niedrigen Mengen an Cholesterol und Sphingolipiden in der Zellmembran, einer verringerten Ordnung der Membranlipide, einer Ansammlung von Sphingolipiden in Lysosomen, sowie verminderter Zell-ausbreitung und vermindertem Größenwachstum.

Zusammengefasst bietet diese Arbeit neue Einblicke in die koordinierte Regulation der zellulären Homöostase und ihre Bedeutung für die Virusinfektion.