

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Analyse des Eintritts von Ebolaviren in
Makrophagen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Franziska Dahlmann geb. Kaup
Hannover
Hannover 2014

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Stefan Pöhlmann
Deutsches Primatenzentrum Göttingen
Abteilung Infektionsbiologie

Univ.-Prof. Georg Herrler
Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Virologie

1. Gutachter: Univ.-Prof. Georg Herrler
Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Virologie
2. Gutachterin: Univ.-Prof. Marion Hewicker-Trautwein
Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 21.Mai 2014

Meiner Familie

Teile der vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen folgender Tagungen präsentiert:

KAUP F., K. GNIRß, C. B. KARSTEN, A. KRÜGER, M. KIENE, H. HOFMANN u. S. PÖHLMANN:

Ebola virus entry into host cells: Analysis of receptor candidates

Poster, 22nd Annual Meeting of the Society for Virology

14.-17. März 2012, Essen

KAUP F., K. GNIRß, C. B. KARSTEN, A. KRÜGER, M. KIENE, H. HOFMANN u. S. PÖHLMANN:

Ebola virus entry into host cells: Analysis of receptor candidates

Vortrag, American Society for Virology 31st Annual Meeting

21.-25. Juli 2012, Madison, Wisconsin, USA

KAUP F., C. KARSTEN, K. GNIRß, M. KIENE, A. KRÜGER, S. PÖHLMANN u. H. HOFMANN:

Ebola virus entry into host cells: Analysis of new receptor candidates

Vortrag, National Symposium on Zoonoses Research 2012

11.-12. Oktober 2012, Berlin

KAUP F., K. GNIRß, C. B. KARSTEN, A. KRÜGER, M. KIENE, H. HOFMANN u. S. PÖHLMANN:

Analysis of host cell factors promoting Ebola virus entry into human macrophages

Vortrag, 23rd Annual Meeting of the Society for Virology

06.-09. März 2013, Kiel

DAHLMANN F., N. BIEDENKOPF, S. BECKER, A. KRÜGER, H. HOFMANN u. S. PÖHLMANN:

Host cell factors promoting Ebola virus entry into human macrophages

Vortrag, National Symposium on Zoonoses Research 2013

19.-20. September 2013, Berlin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Zoonotische Bedeutung	3
2.2 Symptome.....	4
2.3 Pathogenese und Pathologie.....	5
2.4 Virusstruktur.....	7
2.5 Replikationszyklus	9
2.6 Eintritt von Ebolaviren in Wirtszellen.....	11
2.6.1 Das Ebolavirus-Glykoprotein.....	11
2.6.2 Anheftungsfaktoren	15
2.6.3 Signalmoleküle.....	21
2.6.4 Makropinozytose	25
2.6.5 Weitere Endozytosevorgänge	27
2.6.6 Cathepsine	29
2.6.7 NPC1.....	29
2.6.8 Eintritt von Ebolavirus in Makrophagen	31
2.7 Apoptoseerkennung.....	33
2.7.1 Ebolavirus und Apoptose	33
2.7.2 Apoptose: Erkennung durch Makrophagen	34
3 Ziele der Arbeit.....	39
4 Material und Methoden.....	41
4.1 Materialübersicht	41
4.1.1 Zelllinien	41
4.1.2 Zellkulturmedium und Zusätze	42
4.1.3 Plasmide	43
4.1.4 siRNA.....	44
4.1.5 Antikörper.....	45

4.1.6	Reagenzien und Puffer.....	46
4.1.7	Verbrauchsmaterial	51
4.2	Methoden.....	51
4.2.1	Zellkultur.....	51
4.2.2	Isolation humaner primärer Makrophagen.....	52
4.2.3	Isolation von Mausmakrophagen	53
4.2.4	Herstellung Plasmide	55
4.2.5	Transfektionen	56
4.2.6	Expressionsversuche	57
4.2.7	Bindungsassay.....	60
4.2.8	Inhibitionsexperimente	60
4.2.9	Western Blot Analysen	62
4.2.10	Infektion von Makrophagen mit replikationsfähigem Ebolavirus.....	63
4.2.11	Computerprogramme	64
5	Manuskript.....	65
6	Diskussion.....	105
6.1	Lektine	105
6.2	TIM-1	108
6.3	TAM Rezeptor-Tyrosinkinase	109
6.4	Integrine.....	112
6.5	Makropinozytose.....	113
6.6	NPC1	114
6.7	SR-A	115
6.8	Ausblick	118
7	Literaturverzeichnis	119
8	Anhang.....	159
9	Zusammenfassung.....	165
10	Summary.....	167
11	Danksagung.....	169

Abkürzungsverzeichnis

Δ-Peptid	Deltapeptid
°C	Grad Celsius
AKT	Proteinkinase B
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxydisulphat
AS	Aminosäure
ASGPR-1	Asialoglykoproteinrezeptor-1
ASMase	Saure Sphingomyelinase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BDBV	Bundibugyo ebolavirus
bzw.	beziehungsweise
C1QBP	Komplementkomponente 1, Q Subkomponentenbindendes Protein (engl. <i>complement component 1, Q subcomponent-binding protein</i>)
CatB	Cathepsin B
CatL	Cathepsin C
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CLEC5A	<i>C-type lectin domain family 5, member A</i>
CR	Komplementrezeptor
c.p.s.	<i>counts per second</i>
Ct-Wert	Schwellenwert eines Amplifikationszyklus (engl. <i>cycle threshold</i>)
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>

X

DC-SIGNR	<i>DC-SIGN related</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige RNA
EBOV	Zaire eboavirus
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>Fluorescence activated cell sorting</i>)
Fc	<i>fragment crystallizable region</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FP	Fusionspeptid
FR α	Folatrezeptor alpha
g	Erdbeschleunigung – Maßeinheit bei der Zentrifugation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gas6	<i>growth-arrest-specific gene-6</i> Produkt
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GlcNac	N-Acetylglucosamin
GOLGI	Golgi-Apparat
GP	Glykoprotein
GP0	Glykoprotein 1 + 2
GP1	Glykoprotein 1
GP2	Glykoprotein 2
GPI-verankert	Glycosylphosphatidylinositol-verankert
GUSB	Betaglucuronidase
h	Stunde
HAVCR1	<i>Hepatitis A Virus cellular receptor 1</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HIV gp120	Glykoprotein 120 des Humanen Immundefizienzvirus
hMGL	humanes Makrophagen Galactose/ N-Acetylgalactosamin-spezifisches C-Typ Lektin
HOPS-Komplex	<i>homotypic fusion and vacuole protein-sorting-Komplex</i>
HR	<i>heptad repeat</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>Horseradish peroxidase</i>)
HSV	Herpes simplex Virus
ICAM-3	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 3
IFITM	Interferon-induziertes Transmembranprotein
IFN- α/β	Interferon alpha beziehungsweise beta
IFN- β	Interferon beta
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IKK ϵ	I κ B kinase
IL	Interleukin
IRF-3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
JAK-STAT	<i>Janus kinase and signal transducer and activator of transcription</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (engl. <i>Low density lipoprotein</i>)
LOX-1	<i>lectin-like oxidized LDL receptor-1</i>
L-Protein	RNA-abhängige RNA-Polymerase
LPS	Lipopolysaccharid
LSEctin	<i>Liver/lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin</i>
L-SIGN	<i>liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecules-3 grabbing non-integrin</i>
mA	Milliampère

ManNac	N-Acetyl-D-mannosamin
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MARV	Marburgvirus
MBL	Mannose-bindendes Lektin
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
Min.	Minute
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
ml	Milliliter
MLV-G	Murines Leukämievirus Oberflächenglykoprotein
MoAM	<i>monocyte adhesion medium</i>
MOI	Multiplizität der Infektion (engl. <i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μ l	Mikroliter
Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	Natrium-Wasserstoff-Ionen-Austauscher
N-glykosyliert	am Stickstoffatom glykosyliert
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
nm	Nanometer
NP	Nukleokapsidprotein
NPC1	Niemann-Pick C1 Protein
NPC1L1	NPC1 ähnliches Protein 1 (engl. <i>Niemann-Pick C1-like protein 1</i>)
NPC2	Niemann-Pick C2 Protein
O-glykosyliert	am Sauerstoffatom glykosyliert
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)

PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
PMO	Phosphorodiamidate-morpholino-Oligomere
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdSer	Phosphatidylserin
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
RESTV	Reston ebolavirus
RGD	RGD-Sequenz: Aminosäuresequenz aus Arginin (R), Glycin (G), Asparaginsäure (D)
Rho GTPase	Rho Guanosin triphosphat-Hydrolase
RhoA, B, C	<i>Ras homolog gene family member A, B, C</i>
RNA	Ribonukleinsäure
S2,3,4	Sicherheitsstufe 2,3,4 (engl. <i>biosafety level 2,3,4</i>)
SARS-S	<i>severe acute respiratory syndrome-related coronavirus spike protein</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Sek.	Sekunde
sGP	Sezerniertes Glykoprotein
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SM	Sphingomyelin
SR-A	<i>scavenger receptor A</i>
SR-AI, SR-AII, SR-AIII	<i>scavenger receptor A</i> , Isotyp I, II, III
SR-BI	<i>scavenger receptor BI</i>
ssGP	Kleines sezerniertes Glykoprotein
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUDV	Sudan ebolavirus

TAFV	Tai Forest ebolavirus
TAM Rezeptoren	Tyro3/ Axl/ Mer Rezeptor-Tyrosinkinasen
Tc1	Zytotoxische T-Zelle
T _H 1, T _H 2	T-Helferzellen
TIM	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain gene</i>
TBK-1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VLP	Virusähnliches Partikel (engl. <i>virus-like particle</i>)
VP	Virales Protein
Wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Darstellung des Ebolavirus-Genoms mit schematischer Abfolge der kodierenden Sequenzen
- Abbildung 2 Darstellung des Eintritts von Ebolaviren in ihre Zielzellen
- Abbildung 3 Übersicht über die untersuchten Faktoren im Rahmen des Eintritts von Ebolaviren
- Abbildung 4 Schematische Darstellung des Ebolavirus-Glykoproteins
- Abbildung 5 Übersicht über die Eintrittswege von Viren durch Aufnahme in zelluläre Vesikel
- Abbildung S1 Die Lektine hMR und hMGL verstärken den GP-vermittelten Eintritt nicht.
- Abbildung S2 Lösliches GP bindet weder SR-A1, SR-A2 noch Mer.
- Abbildung S3 Die GP-vermittelte Aufnahme via Makropinozytose kann Dosis-abhängig inhibiert werden.
- Abbildung S4 NPC1 wird spezifisch herunter reguliert.
- Abbildung S5 Die transiente Expression von SR-A Isoformen erhöht nicht die GP-vermittelte Transduktion, während ein SR-A Inhibitor die Transduktion vermindert.
- Abbildung S6 SR-A *knockout* führt nicht zu einer verminderten Transduktion muriner Makrophagen.

1 Einleitung

Das Ebolavirus gehört zur Familie der Filoviren, die hämorrhagische Fieber mit hoher Sterblichkeitsrate bei Affen und Menschen hervorrufen. Nicht erst seit dem Film "The Outbreak" zählt das Ebolavirus zu den bekanntesten tödlichen Viren, die nur in Laboratorien der höchsten Sicherheitsstufe, S4, untersucht werden können.

Das Ebolavirus wird von Flughunden direkt oder über andere Tierspezies auf den Menschen übertragen (LEROY et al. 2005), ein Übertragungsweg, den man als Zoonose bezeichnet. Es treten regelmäßig Infektionen in Afrika auf, die neben menschlichen Todesfällen auch den Rückgang der Population von Menschenaffen verursachen (LEROY et al. 2004).

Der erste Ausbruch von Filoviren, der 1967 in Laboratorien in Marburg (das Virus wurde später „Marburgvirus“ genannt) und Frankfurt am Main registriert wurde und mit 7 Todesfällen verbunden war, zeigt auf, welche mögliche Gefahr von Filoviren auch in Deutschland ausgeht. Neben Importen von infizierten Tieren besteht auch durch das gesteigerte Reiseaufkommen in afrikanische Länder ein erhöhtes Potential der Einbringung von Filoviren.

Gegenwärtig ist weder eine Therapie noch eine Vakzine zum Schutz vor der Filovirus-Infektion verfügbar, was nicht zuletzt darauf zurückzuführen ist, dass nicht geklärt ist, wie das Virus in die Zelle eindringt. Bekannt ist, dass der Eintritt über das einzige virale Oberflächenprotein vermittelt wird: das Glykoprotein (GP). Um den Eintrittsmechanismus nicht unter S4 Bedingungen untersuchen zu müssen, kann das GP der Filoviren in virale Vektoren eingebaut werden. Diese zeigen einen mit dem Wildtypvirus vergleichbaren Zelltropismus (TAKADA et al. 1997, WOOL-LEWIS u. BATES 1998) und erlauben die Analyse des GP-vermittelten Zelleintritts im Hochdurchsatzformat.

Es wurde beschrieben, dass mehrere zelluläre Oberflächenmoleküle den Eintritt von Ebolavirus in Zelllinien fördern. Dazu zählen Lektine wie das DC-SIGN-Protein (ALVAREZ et al. 2002), das Zuckerstrukturen bindet, die auf der Oberfläche des viralen GP präsentiert werden. Daneben wurden TIM-1 (KONDRATOWICZ et al. 2011) und TAM Rezeptor-Tyrosinkinasen (Axl, Tyro3 und Mer) beschrieben

(SHIMOJIMA et al. 2006), die direkt oder indirekt an Phosphatidylserin binden, das auf der Außenseite der Virushülle zu finden ist. Weiterhin wurde ein Beitrag von Integrinen zum Eintritt von Ebolaviren in Zielzellen beschrieben. Nach der Aufnahme der Viren in Wirtszellendosomen entfernt die Protease Cathepsin B Teile des viralen GPs und ermöglicht damit die Bindung von GP an den Cholesteroltransporter NPC1. Nach der Bindung an NPC1 vermittelt GP die Fusion der Virusmembran mit der endosomalen Membran. Die Membranfusion erlaubt das Einschleusen der viralen Erbinformation in das Zytoplasma, wo die virale Transkription und Genom-Replikation erfolgt.

Makrophagen und dendritische Zellen sind die wichtigsten Zielzellen der Filovirus-Infektion (GEISBERT 2003). Es ist dennoch weitgehend unbekannt, ob die oben genannten zellulären Faktoren, die den Eintritt des Ebolavirus in Zelllinien fördern, auch für die Infektion dieser Primärzellen wichtig sind. Diese Frage sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit beantwortet werden. Außerdem sollten mögliche weitere Faktoren identifiziert werden, die für den viralen Eintritt in Makrophagen wichtig sind.

2 Literaturübersicht

Das Ebola hämorrhagische Fieber (EHF) gehört mit einer Letalität von bis zu 90% zu den tödlichsten bekannten Infektionskrankheiten. Nach dem ersten Auftreten von EHF im Sudan und der Demokratischen Republik Kongo im Jahr 1976 konnte kurz darauf der Erreger identifiziert werden: das Ebolavirus (PATTYN et al. 1977, BOWEN et al. 1977, JOHNSON et al. 1977).

Heute ist bekannt, dass die Ebola- und Marburgviren zur Familie der *Filoviridae* gehören, die der Ordnung Mononegavirales zugeordnet wird. Das Genus *Ebolavirus* enthält fünf Spezies, Zaire ebolavirus (EBOV), Sudan ebolavirus (SUDV), Bundibugyo ebolavirus (BDBV), Tai Forest ebolavirus (TAFV) und Reston ebolavirus (RESTV)(KUHNS et al. 2013, INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES 2012). Die letzten EHF-Ausbrüche wurden im März 2014 erstmals in Guinea registriert und sind auf die Infektion mit EBOV zurückzuführen (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2014). Das Genus Marburgvirus enthält dagegen nur eine Spezies, Marburg marburgvirus (MARV). Als ein weiteres Genus wurde das Cuevavirus (Spezies Lloviu cuevavirus) vorgeschlagen (KUHNS et al. 2013), ein 2011 in europäischen Fledermäusen entdecktes Virus (NEGREDO et al. 2011).

2.1 Zoonotische Bedeutung

Ebolaviren zählen zu den gefährlichsten humanpathogenen Erregern. Neben Todesfällen beim Menschen sind auch fatale Verläufe bei Schimpansen, Gorillas und Waldantilopen (Duckern) bekannt (LEROY et al. 2004). Im Gegensatz dazu steht RESTV, das wahrscheinlich nicht humanpathogen ist, aber Erkrankungen in experimentell infizierten Javaner- und Rhesusaffen hervorruft (MIRANDA u. MIRANDA 2011). Das Virus konnte aus Schweinen isoliert werden (BARRETTE et al. 2009), die in Betrieben auf den Philippinen gehalten wurden. In Mitarbeitern dieser Betriebe wurden Virus-spezifische Antikörper (IgG) detektiert, es wurden jedoch keine Krankheitssymptome dokumentiert.

Als natürliches Reservoir für Ebolaviren gelten Flughunde (LEROY et al. 2005). Das Marburgvirus konnte bereits aus Nilflughunden isoliert werden (TOWNER et al.

2009), interessanterweise ist eine Isolation von Ebolaviren aus Flughunden bis heute nicht gelungen. Lediglich Antikörper und Nukleotidsequenzen (LEROY et al. 2005) konnten detektiert werden. Als Wirtsspezies werden der Hammerkopf (*Hypsignathus monstrosus*), *Epomops franqueti* und der Schmalkragen-Flughund (*Myonycteris torquata*) betrachtet (LEROY et al. 2005).

2.2 Symptome

Die Inkubationszeit nach der Infektion mit Ebolaviren beträgt im Durchschnitt 4-10 Tage (FELDMANN u. GEISBERT 2011). Danach treten zunächst unspezifische Symptome auf wie Schüttelfrost, Myalgien und Arthralgien, Kopfschmerzen und Fieber. Im Anschluss manifestiert sich die Infektion im gesamten Organsystem, sodass vielfältige Symptome auftreten können. Häufige Symptome umfassen gastrointestinale Beschwerden mit Anorexie, Diarrhoe und Bauchschmerzen, nicht immer gepaart mit Erbrechen. Auch respiratorische (Brustschmerzen, Husten, Nasenausfluss), vaskuläre (konjunktivale Injektion, Hypotension, Ödeme) und neurologische (Konfusion, Koma, Schwindel) Beschwerden können auftreten sowie hämorrhagische (Petechien, Ekchymosen) Symptome. Einhergehend mit Hämorrhagien der mukosalen Membranen kann es zu Hämatemesis und Meläna kommen (PATTYN 1978, FELDMANN u. GEISBERT 2011).

Hämatologische Parameter umfassen eine Neutrophilie, Lymphopenie und Thrombozytopenie und weisen auf eine Koagulopathie hin. Des Weiteren treten erhöhte Leberwerte (AST, ALT), eine Hyperproteinämie und Proteinurie auf. Eine disseminierte intravasale Koagulopathie wie im Affenmodell konnte im Menschen noch nicht bestätigt werden (GEISBERT et al. 2003a, GEISBERT et al. 2003b, GEISBERT et al. 2003c). Multiorganversagen infolge der Virusreplikation und der hohe Flüssigkeitsverlust können letztlich zu einem Schock-bedingten Tod 6-16 Tage nach Auftreten der Symptome führen (FELDMANN u. GEISBERT 2011, MODROW et al. 2010).

Da keine Therapeutika zur Verfügung stehen, kann nur symptomatisch behandelt werden. Ein wirksamer Impfstoff steht zurzeit ebenfalls nicht zur Verfügung. Erste Erfolge mit möglichen Impfstoffen konnten bisher im Makaken-Modell verbucht

werden. Dieses Modell spiegelt eine humane Infektion am besten wider und ist der Goldstandard in der Impfstoffentwicklung gegen Ebolaviren. So konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit einem Antikörpercocktail zwei Tage nach der Infektion mit EBOV bis zu 67% der Tiere retten konnte. Wurde diese Behandlung nach Einsetzen erster Symptome begonnen, überlebten noch 43% der Tiere die Infektion (OLINGER et al. 2012, PETTITT J 2013). Weitere Therapiemöglichkeiten, umfassen VSV-Vektoren, Hyperimmunseren, aber auch die Behandlung mit siRNA und PMOs (Phosphorodiamidate morpholino Oligomere, Nukleinsäure-Analoga) (WAHL-JENSEN et al. 2012). Der Einsatz von Blutkonserven konvaleszenter Patienten rettete 1995 7 von 8 Menschen das Leben (MUPAPA 1999), im Makakenmodell konnte dies aber nicht reproduziert werden (JAHRLING et al. 2007). Problematisch ist vor allem die fehlende Kreuzreaktivität der Antikörper gegen unterschiedliche Virusspezies.

2.3 Pathogenese und Pathologie

Um zu einer Entwicklung neuer Therapeutika beizutragen, muss zunächst der Mechanismus der Pathogenese verstanden werden. Ebolaviren werden über direkten Kontakt mit Körpersekreten infizierter Personen verbreitet. Der Viruseintritt erfolgt nach Kontakt mit erkrankten oder verstorbenen Personen oder Tieren über Schleimhäute oder Hautverletzungen. Eine Aerosol-vermittelte Übertragung konnte im Tiermodell gezeigt werden (JOHNSON et al. 1995, WEINGARTL et al. 2012), scheint aber bei natürlichen Infektionen eine untergeordnete Rolle zu spielen (DOWELL et al. 1999).

Als primäre Zielzellen haben sich im Affenmodell Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen herausgestellt (GEISBERT et al. 2003a). Nach einer primären Virämie gelangen Ebolaviren über den lymphatischen Weg mit Hilfe infizierter Monozyten oder dendritischer Zellen zu den primären Lymphknoten. Alternativ erreichen Ebolaviren hämatogen die Leber und Milz, wo sie in Gewebsmakrophagen replizieren. Anschließend werden auch Zellen des Parenchyms infiziert gefolgt von Endothelzellen und letztendlich auch Epithelzellen. Ebolaviren weisen somit einen

extrem breit gefächerten Zelltropismus auf, mit Ausnahme von Lymphozyten sind alle Zelltypen infizierbar.

Es gibt Hinweise, dass die umfassenden Hämorrhagien nicht primär durch Infektion der Endothelzellen entstehen, sondern auf Mediatoren-bedingter Schädigung beruhen (GEISBERT et al. 2003c). So setzen infizierte Makrophagen verschiedene proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β), Chemokine (MIP-1 α) und Stickstoffmonoxid frei. Diese Faktoren rekrutieren nicht nur weitere Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten, sondern erhöhen auch die Gefäßpermeabilität. Daneben können sie eine Apoptose der Lymphozyten induzieren, was eine massive Lymphopenie zur Folge hat (GEISBERT et al. 2003c). Darüber hinaus schütten infizierte Makrophagen und nekrotische Zellen Gewebsthromboplastin aus, das die extrinsische Gerinnungskaskade und somit eine Koagulation auslöst (BRAY u. GEISBERT 2005). Gepaart mit einer Schädigung der Leber und somit einer reduzierten Produktion von Gerinnungsfaktoren kommt es zu einer Störung der Hämostase, was Hämorrhagien nach sich zieht.

Infolge der Virusreplikation entstehen Nekrosen insbesondere in der Leber und in lymphatischen Geweben. Des Weiteren treten disseminierte Petechien und Ekchymosen in der Haut, mukösen Membranen und viszeralen Organen auf. Histologisch finden sich eosinophile, filamentöse bis ovale Einschlusskörperchen im Zytoplasma, bei denen es sich um Aggregate viraler Nukleokapside handelt. Diese sind, neben Viruspartikeln, insbesondere in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (mononukleären Phagozyten), Endothelzellen, Fibroblasten und im Interstitium zu finden.

In der Leber zeigen sich hepatozelluläre Nekrosen, Councilman-Körperchen, eine mikrovesikuläre Steatose und eine Kupferzellhyperplasie. Einschlusskörperchen sind vor allem periportal und um nekrotische Bereiche nachweisbar. In lymphatischen Geweben sind lymphoide Depletionen und vaskuläre, follikuläre Nekrosen erkennbar, während in der Niere beispielsweise tubuläre Nekrosen auftreten, die sowohl schockbedingt als auch infolge der Infektion epithelialer Strukturen hervorgerufen sein können (ZAKI u. GOLDSMITH 1999).

Es wird deutlich, dass die Pathogenität von Ebolaviren einerseits bedingt ist durch das Eingreifen in das Immunsystem, indem sie Zellen des Immunsystems infizieren. Andererseits tragen der Pantropismus und die hohe Replikationsrate zum Krankheitsverlauf bei.

Die hohe Letalität, die mit der Ebolavirus-Infektion einhergeht, in Kombination mit fehlender Virus-spezifischer Therapie unterstreicht die Wichtigkeit, den Mechanismus der Infektion in Form des zellulären Eintritts besser zu verstehen. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen des Viruseintritts ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, auf den nun im Detail eingegangen werden soll.

2.4 Virusstruktur

Ebolaviren tragen ein einzelsträngiges, nicht segmentiertes RNA-Genom mit negativer Polarität. Sie werden von einer Lipidschicht umhüllt, die von der Wirtszelle stammt. Elektronenmikroskopisch stellen sich Ebolaviren pleomorph fadenförmig dar. Verzweigte Filamente sind ebenso möglich wie U-förmige oder spiralg aufgewickelte Viruspartikel. Der Durchmesser beträgt im Schnitt 80 nm, die Länge variiert von ~1000 nm (BENIAC et al. 2012) bis 14.000 nm (MODROW et al. 2010), häufig sind jedoch Partikel um 1250 nm Länge (HOENEN et al. 2006).

Die virale, nicht-infektiöse RNA umfasst 18,9 kb und kodiert für sieben Strukturproteine und ein Nichtstrukturprotein. Sie ist im Folgenden schematisch dargestellt mit Unterteilung in die kodierenden Sequenzen:



Abbildung 1: Darstellung des Ebolavirus-Genoms mit schematischer Abfolge der kodierenden Sequenzen; NP: Nukleokapsidprotein, VP35: Polymerase-Kofaktor, VP40: Major-Matrixprotein, GP: Glykoprotein, VP30: Transkriptionsaktivator, VP24: Minor-Matrixprotein, L: RNA-Polymerase, nk: nicht kodierende Sequenzen.

NP steht für das Nukleokapsidprotein, das zusammen mit dem Phosphoprotein VP35, dem viralen Protein VP30 und dem L-Protein, der RNA-abhängigen RNA Polymerase, sowie der viralen RNA den helikalen Nukleokapsidkomplex bildet. Dieser ist essentiell für die Transkription (MUHLBERGER et al. 1999). Als Polymerase-Kofaktor wirkt VP35, während VP30 den Aktivator der Transkription darstellt (MUHLBERGER 2007). VP35 tritt in Wechselwirkung mit dem Major-Matrixprotein (VP40) und dem Minor-Matrixprotein (VP24). Daran angelagert befindet sich als Virushülle eine Doppellipidschicht, auf deren Oberfläche Glykoproteintrimere (GP) eingelagert sind (siehe auch Abbildung 4). Neben dem membranständigen GP wird auch eine sezernierte Form des Glykoproteins (sGP) gebildet (SANCHEZ et al. 1996). Auf die Funktion von GP wird im Verlauf näher eingegangen.

Neben den genannten Funktionen in der Virusvermehrung wurden VP35 und VP24 auch die Rolle viraler Interferon (IFN)-Antagonisten zugesprochen (BASLER et al. 2000, REID et al. 2006). So inhibiert VP35 die Produktion von IFN- α/β , indem es mit den Kinasen IKK ϵ und TBK-1 interagiert. Dadurch bleibt die Aktivierung nachfolgender IFN-regulierender Transkriptionsfaktoren (IRF3, IRF7) aus, sodass IFN- α/β nicht transkribiert werden. Daneben blockiert VP35 die dsRNA-abhängige Proteinkinase, was ebenfalls die IFN- β -Produktion verhindert (BASLER u. AMARASINGHE 2009).

VP24 greift an anderer Stelle ein. Es verhindert durch Modulation des JAK-STAT-Signalwegs die Akkumulation von aktiviertem STAT1 im Nukleus der Zelle, sodass eine Transkription von IFN-induzierten Genen verhindert wird (REID et al. 2006, MATEO et al. 2010). Zahlreiche IFN-induzierte Gene kodieren für Proteine mit antiviraler Aktivität wie z.B. IFITM1, 2 und 3, die den Eintritt von Ebolaviren in Zielzellen hemmen können (HUANG et al. 2011, KUHL u. POHLMANN 2012). Somit hat das Ebolavirus zwei Methoden entwickelt, der angeborenen Immunantwort zu entgehen. Einerseits hemmt es die Produktion von IFN, andererseits unterbindet es die durch IFN induzierten Signalwege (REID et al. 2006, BASLER u. AMARASINGHE 2009).

2.5 Replikationszyklus

Einige membranständige Wirtszellfaktoren wurden bisher mit dem Eintritt von Ebolaviren in Verbindung gebracht. Ein einziger Eintritt-vermittelnder Rezeptor, der aufgrund des sehr breiten Zelltropismus ubiquitär vorhanden sein sollte, ist bisher nicht bekannt.

Stattdessen wurden verschiedene Moleküle in Betracht gezogen, die zu den Lektinen (ALVAREZ et al. 2002, LIN et al. 2003, GRAMBERG et al. 2005, TAKADA 2004), Integrinen (TAKADA et al. 2000) und Rezeptor-Tyrosinkinasen (SHIMOJIMA et al. 2006) zählen, ebenso der Folatrezeptor α (CHAN et al. 2001) und der Phosphatidylserinrezeptor TIM-1 (*T cell immunoglobulin and mucin domain gene product -1*) (KONDRATOWICZ et al. 2011). Auf diese soll im Verlauf genauer eingegangen werden. Nach der Bindung an die Zielzelle wird das Virus möglicherweise über den Weg der Makropinozytose aufgenommen (NANBO et al. 2010, SAEED et al. 2010, ALEKSANDROWICZ et al. 2011, MULHERKAR et al. 2011). Im Endosom/ Lysosom entfernen pH-abhängige Cathepsine Teile des GP1, wodurch die Rezeptorbindungsdomäne freigelegt wird (CHANDRAN et al. 2005, SCHORNBERG et al. 2006, DUBE et al. 2009, LEE u. SAPHIRE 2009). Dadurch kann NPC1 (Niemann-Pick C1 Protein), ein Cholesteroltransporter, an das GP1 binden. Auf die Funktionen dieser Moleküle für den Eintritt von Ebolaviren soll im späteren Verlauf genauer eingegangen werden. Unbekannte weitere Faktoren triggern anschließend die Virus-Membran-Fusion und die virale RNA wird in das Zytoplasma entlassen (HOFMANN-WINKLER et al. 2012) (Abbildung 2).

Aufgrund der negativen Orientierung der einzelsträngigen, viralen RNA wird diese zu Beginn der Replikation in ein positiv-orientiertes Antigenom transkribiert. Sowohl die virale RNA als auch das Antigenom sind von den Nukleokapsidproteinen umhüllt, die Proteine des Polymerasekomplexes darstellen. Dieser besteht, wie bereits erwähnt, aus dem Nukleokapsidprotein NP, VP35 und dem L-Protein. VP30 aktiviert die Transkription (MUHLBERGER et al. 1999). Der Polymerasekomplex bewegt sich in 3'-5' Richtung, wobei die Transkription immer wieder stoppt und neu initiiert wird, sodass entsprechend des viralen Genoms sieben monocistronische mRNAs

entstehen. Dadurch entstehen mehr mRNAs des ersten Gens im Vergleich zu den folgenden Genen. Parallel entstehen mRNAs als Matrizen für die virale genomische RNA (MUHLBERGER 2007).

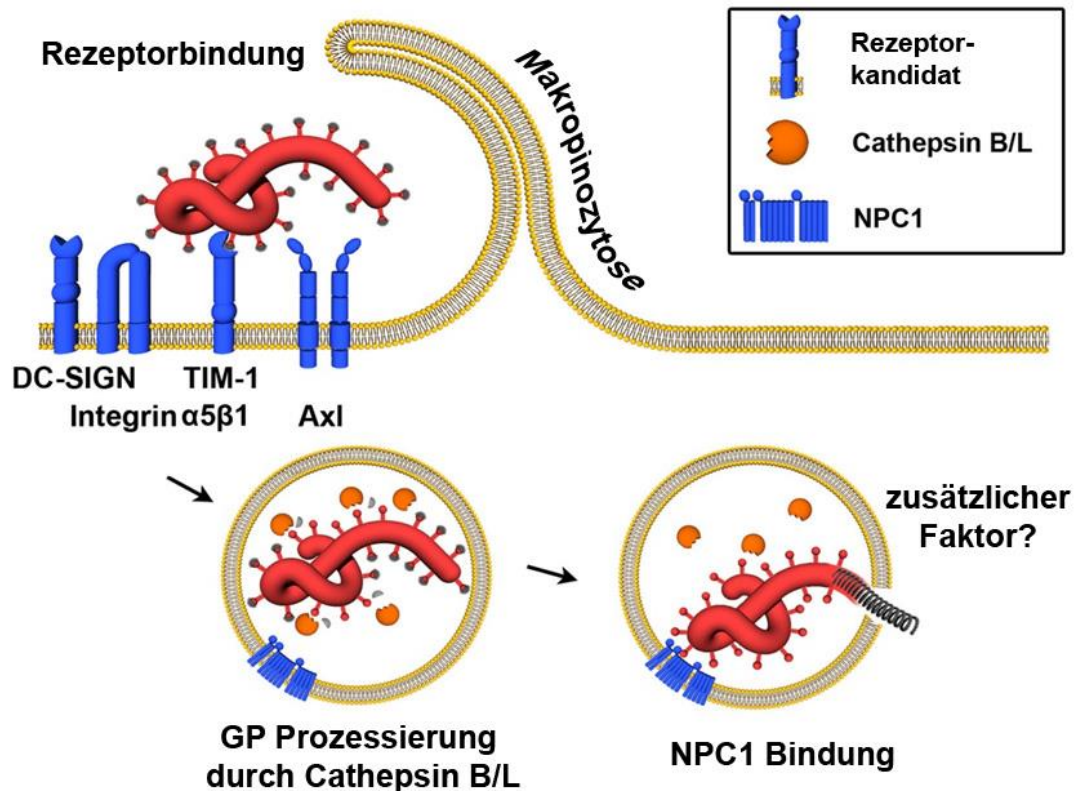


Abbildung 2: Darstellung des Eintritts von Ebolaviren in ihre Zielzellen. Nach der Interaktion des GPs mit zellulären Oberflächenmolekülen wird das Virus über den Weg der Makropinozytose aufgenommen. Im Endosom entfernen Cathepsine die Glykankappe, was die Bindung von GP an NPC1 ermöglicht. Unbekannte weitere Faktoren bedingen die Freisetzung der viralen RNA in das Zytoplasma.

Im Rahmen der folgenden Translation entstehen die Strukturproteine und das Nichtstrukturprotein sGP, das sezerniert wird (SANCHEZ 1998). VP40 und GP werden an die Zellmembran transportiert, wo sie in Cholesterin-reichen Mikrodomänen, den *Lipid Rafts*, akkumulieren (BAVARI 2002, JASENOSKY u. KAWAOKA 2004). NP, VP24 und VP35 formen gemeinsam mit der neuen viralen RNA das Nukleocapsid (BHARAT et al. 2012, NODA et al. 2006). Die Nukleocapside

budden an den *Lipid Rafts* und geben den Virionen ihre endgültige Form. Die fertigen Virionen variieren in ihrer Form und Größe. So gibt es einzelne und kontinuierliche Partikel sowie verbundene Virionen. Die einzelnen Virionen enthalten möglicherweise nur eine Kopie des Genoms. Die kontinuierlichen Partikel sind ununterbrochen aneinander gereihte Virionen, während die verbundenen Partikel einzelne Virionen darstellen, die nur durch die Hülle miteinander verknüpft sind (BENIAC et al. 2012).

Der Fokus soll im Folgenden auf dem Eintrittsprozess von Ebolaviren bis zu der lysosomalen Bindung von GP an NPC1 liegen.

2.6 Eintritt von Ebolaviren in Wirtszellen

Für zahlreiche Viren ist bekannt, dass die Bindung an einen oder mehrere Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche für den zellulären Eintritt essentiell ist, und die Expression dieser Rezeptoren bestimmt wesentlich den viralen Zelltropismus. Für Ebolaviren wurden jedoch keine Rezeptoren (definiert als zelluläre Faktoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, an virale Glykoproteine binden und für den Viruseintritt essentiell sind) beschrieben. Es ist jedoch eine Reihe von Faktoren bekannt, die die virale Anheftung an bestimmte Zielzellen fördern und die daher im Folgenden als Anheftungsfaktoren bezeichnet werden, eine Übersicht liefert Abbildung 3. Daneben wurden weitere Faktoren beschrieben, die den Eintritt von Ebolaviren beeinflussen, dieser aber nicht auf eine direkte GP-Bindung zurückzuführen ist. Diese Faktoren werden hier als Signalmoleküle bezeichnet (Abbildung 3).

2.6.1 Das Ebolavirus-Glykoprotein

Das Ebolavirus-Glykoprotein (GP) nimmt eine zentrale Rolle beim viralen Eintritt ein – als einziges membranständiges Protein vermittelt es die Virusbindung und -aufnahme in die Zelle. Außerdem stellt GP einen Virulenzfaktor dar (GROSETH et al. 2012). Die Sequenz des GP-ORF (offener Leserahmen) unterscheidet sich um etwa 40% zwischen den Ebolavirus Spezies (SANCHEZ et al. 1996). Der GP-ORF kodiert für sGP. In etwa 20% der Transkripte wird jedoch durch die virale Polymerase ein zusätzliches Adenosin eingebaut (*RNA-editing*), so dass sie für membranständiges

GP kodieren. Die N-terminalen Sequenzen (295 AS bei EBOV) von sGP und GP stimmen überein (VOLCHKOV et al. 1995, FELDMANN et al. 2001).

Anheftungsfaktoren	Signalmoleküle
Lektine	TAM Rezeptoren
ASGPR-1	Axl
DC-SIGN/ R	Tyro3
LSEctin	Mer
hMGL	Integrine
TIM Familie	$\alpha 5\beta 1$
TIM-1, -3, -4	

Abbildung 3: Übersicht über die untersuchten Faktoren im Rahmen des Eintritts von Ebolaviren.

Nach einer posttranslationalen Spaltung des sGP-Vorläuferproteins durch Furin entstehen das lösliche sGP und das Δ -Peptid (VOLCHKOVA et al. 1999). sGP wird als lösliches Homodimer im Überstand der Zellkultur gefunden und zeigt eine N-terminale Übereinstimmung von ~295 AS mit dem GP. Es wird vermutet, dass das sGP immunmodulierende Wirkungen hat, indem es als Antikörper-decoy wirkt (ITO et al. 2001). Es wurde auch diskutiert, ob sGP Neutrophile aktiviert (SUI u. MARASCO 2002, YANG et al. 1998) und möglicherweise einen antiinflammatorischen Effekt auf Endothelzellen hat (WAHL-JENSEN et al. 2005).

Die Funktionen des Δ -Peptids, das bisher nicht in infektiösem Serum detektiert werden konnte, sind weitgehend unklar. Es wird vermutet, dass es einerseits durch Rezeptorbindung eine Superinfektion infizierter Zellen verhindert (RADOSHITZKY et al. 2011). Andererseits könnte es die Bindung unreifer Virionen an Rezeptoren im ER

unterbinden, indem es während des Reifungsprozesses an diese Rezeptoren bindet und somit das Budding reifer Virionen fördert (RADOSHITZKY et al. 2011).

Durch RNA-Editierung entsteht neben GP durch Einbau von zwei Nukleotiden das „*small soluble GP*“ (ssGP). Es wurde im Zellkulturüberstand nach einer Infektion als Homodimer detektiert, die Funktion bleibt unklar und unterscheidet sich von der des sGP (MEHEDI et al. 2011).

Das GP wird als Vorläuferprotein GP0 synthetisiert und wie sGP durch Furin in zwei Untereinheiten, GP1 und GP2 gespalten (VOLCHKOV et al. 1998)(Abbildung 4). Die GP1-Untereinheit vermittelt die Bindung an zelluläre Rezeptoren während die GP2-Untereinheit die Fusion der viralen Membran mit der Membran von Wirtszellendosomen ermöglicht und das Protein in der Virushülle verankert. Das Vorläuferprotein hat eine Größe von 676 AS (Stamm Mayinga). Es enthält am N-Terminus ein Signalpeptid, das für den Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) sorgt und dort abgespalten wird. Im ER wird das GP0 intensiv N-glykosyliert und zu einem Homotrimer oligomerisiert (SANCHEZ 1998, FELDMANN et al. 2001). Nach dem Transport in den Golgi-Apparat werden dort Acylierungen und O-Glykosylierungen vorgenommen (FELDMANN et al. 2001, ITO et al. 2001). Anschließend wird das Vorläuferprotein durch Furin in die Untereinheiten GP1 und GP2 gespalten. GP1 hat eine Größe von 501 AS inklusive Signalpeptid, GP2 besteht entsprechend aus 175 AS. Diese Spaltung ist für den Eintritt in Wirtszellen und für die Ausbreitung des Virus im Wirt nicht notwendig (NEUMANN 2007, NEUMANN et al. 2002). Die Untereinheiten GP1 und GP2 sind durch eine Disulfidbrücke verbunden und als Homotrimer durch kovalente Verbindungen zwischen GP1-GP2 und GP2-GP2 an der Membranoberfläche organisiert (LEE et al. 2008, HOFMANN-WINKLER et al. 2012).

Die **GP1-Untereinheit** enthält die Rezeptorbindungsdomäne, die innerhalb der Ebolavirus Spezies hoch konserviert ist. Im Vergleich zu den Marburgviren weist diese eine Konservierung von ~55% auf AS Ebene auf, während die Sequenzidentität der GP1-Untereinheit zwischen Ebola- und Marburgviren insgesamt nur ~35% beträgt (KUHN et al. 2006, MANICASSAMY et al. 2005).

Ebolaviren weisen einen hohen Grad an N-Glykosylierung auf, je nach Ebolavirus Spezies werden N-Glykane an 10-17 Stellen angeheftet. Nur der GP1 C-Terminus ist stark O-glykosyliert (reich an Serin, Threonin) und wird daher als Muzin-ähnliche Domäne bezeichnet (RITCHIE et al. 2010). Diese Region ist zwischen den Ebolavirus Spezies sehr variabel.

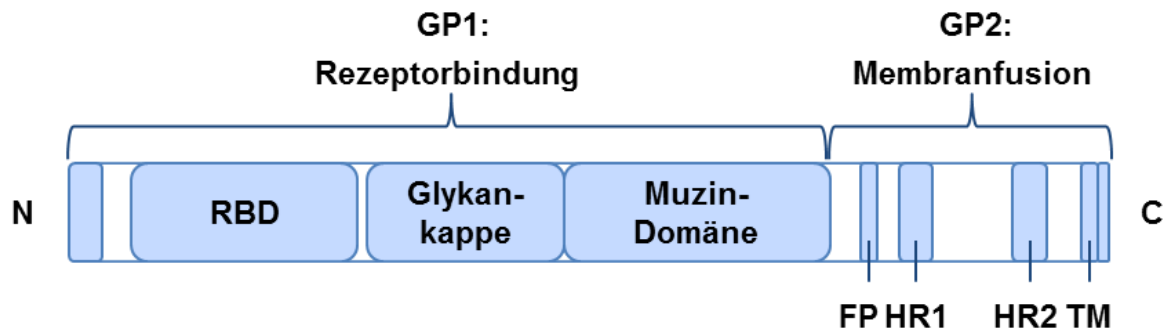


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ebolavirus-Glykoproteins; RBD: Rezeptorbindungs-Domäne, FP: Fusionspeptid, HR1, HR2: Heptadrepeat, TM: Transmembrandomäne. Als Typ 1 Transmembranprotein ist die N-terminale GP1-Untereinheit an der Oberfläche lokalisiert, während die GP2-Untereinheit mit der Transmembrandomäne in der Virushülle verankert ist.

Die Muzin-ähnliche Domäne (Abbildung 4: Muzin-Domäne) ist exponiert an der Oberfläche und bildet zusammen mit einer Glykankappe eine Art Kelch, in dessen Vertiefung die Rezeptorbindungsdomäne enthalten ist. Diese sterische Abschirmung verhindert möglicherweise den Angriff durch neutralisierende Antikörper (LEE et al. 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Muzin-ähnliche Domäne bei Expression des GP an der Zelloberfläche eine Abschirmung von MHC-Molekülen und β_1 -Integrinen verursacht (FRANCICA et al. 2010, NOYORI et al. 2013). So kann das Ebolavirus einerseits die Immunantwort umgehen und andererseits den Zell-Zell-Kontakt unterbinden.

Mit Hilfe retroviraler Vektorsysteme konnte gezeigt werden, dass die Muzin-ähnliche Domäne zwar für einen zytopathischen Effekt verantwortlich ist, allerdings keinen Einfluss auf den Eintritt und den Zelltropismus hat (YANG 2000, SIMMONS et al.

2002, MANICASSAMY et al. 2005). Interessanterweise zeigte sich in diesen Vektorsystemen, dass GP-Mutanten, die eine Deletion für die Muzin-ähnliche Domäne aufweisen, besser in Partikel eingebaut werden und Zielzellen besser transduzieren (JEFFERS et al. 2002), weshalb präferentiell mit diesem System gearbeitet wird.

Die **GP2-Untereinheit** ist essentiell für die Virus-Membran-Fusion. Sie enthält neben der Sequenz für die Membranfusion (FP) auch die Transmembrandomäne (TM), die in der Virushülle verankert ist. C-terminal befindet sich eine kurze Sequenz (4 AS), die ins Virusinnere ragt. Daneben finden sich zwei *heptad repeats* (HR1 und HR2), die *coiled-coil*-Strukturen bilden. Die Bildung der *coiled-coil*-Strukturen führt dazu, dass die endosomale und virale Membran in räumliche Nähe gelangen und fusionieren (WEISSENHORN et al. 1998, GREGORY et al. 2011, MALASHKEVICH et al. 1999).

2.6.2 Anheftungsfaktoren

Lektine

Lektine sind Glykoproteine, die Kohlenhydratstrukturen erkennen. Besonders Calcium-abhängige Lektine wurden im Zusammenhang mit dem filoviralen Zelleintritt untersucht. Aufmerksam auf eine mögliche Rolle von Lektinen im filoviralen Zelleintritt machte die Entdeckung, dass die transiente Expression von Asialoglycoproteinrezeptor 1 (**ASGPR-1**) die Infektion von Fibroblastenzelllinien mit Marburgvirus verstärkte (BECKER et al. 1995). Allerdings konnten auch ASGPR-1-negative Zellen erfolgreich mit Marburgvirus infiziert werden, was zeigt, dass ASGPR1 für den Eintritt verzichtbar ist (BECKER et al. 1995). Später konnte auch ein verstärkender Effekt der ASGPR-1-Expression auf die Transduktion von Zellen mit EBOV-GP-tragenden Vektoren gezeigt werden (LIN et al. 2003, MARZI et al. 2004).

Für GP-tragenden Vektoren wurde mit **DC-SIGN** und **DC-SIGNR** 2002 erstmals ein Einfluss von Lektinen auf den Zelleintritt berichtet (ALVAREZ et al. 2002).

DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*, CD209) ist ein Typ II Transmembranprotein (der C-Terminus ist extrazellulär), das Calcium-abhängig an Mannose- und Fucose-Reste binden kann. Es wird auf dendritischen Zellen, Untergruppen von Makrophagen (fetale, deziduale, alveoläre Makrophagen) (SOILLEUX et al. 2002), aktivierten B-Zellen (HE et al. 2006) und Thrombozyten (BOUKOUR et al. 2006) exprimiert. DC-SIGNR (*DC-SIGN related*, CD209L), auch L-SIGN genannt, ist ein Homolog von DC-SIGN, das ebenfalls an Mannose bindet. Im Gegensatz zu DC-SIGN konnte DC-SIGNR nicht auf peripheren dendritischen Zellen gefunden werden. Es wird auf Endothelzellen von Leber, Lymphknoten und Plazenta exprimiert (POHLMANN et al. 2001b, GRANELLI-PIPERNO et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die gerichtete Expression von DC-SIGN und DC-SIGNR ausreicht, um den GP-vermittelten Eintritt in bestimmte T-Zelllinien zu vermitteln (ALVAREZ et al. 2002). Nachfolgende Studien zeigten jedoch, dass die transiente Expression dieser Lektine nicht ausreicht, um Lymphozyten zu infizieren, die im unbehandelten Zustand nicht für die EBOV-GP-getriebene Infektion empfänglich sind (MARZI et al. 2007, SIMMONS et al. 2003a). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Präinkubation mit dem Mannose-Polymer Mannan die EBOV-Infektion von dendritischen Zellen leicht reduziert. Dieser Befund deutet auf einen moderaten Beitrag von Mannose-spezifischen Lektinen zur EBOV-Infektion von dendritischen Zellen hin (MARZI et al. 2007).

LSEctin (*Liver/lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin*, CLEC4G) gehört, wie die oben genannten Lektine, ebenfalls zur Klasse der C-Typ Lektine. LSEctin befindet sich im gleichen Gencluster wie DC-SIGN und DC-SIGNR. DC-SIGNR und LSEctin werden auf sinusoidalen Endothelzellen in Lymphknoten und Leber koexprimiert (LIU et al. 2004). Zusätzlich dazu wurde LSEctin auch auf dendritischen Zellen, alternativ aktivierten Makrophagen und Thymusmakrophagen gefunden (DOMINGUEZ-SOTO et al. 2007). LSEctin bindet ebenso wie DC-SIGN und DC-SIGNR an Mannose-Reste, erkennt aber auch N-Acetylglucosamin (GlcNac) und Fucose (LIU et al. 2004). Die gerichtete Expression von LSEctin in Zelllinien kann die EBOV-GP-getriebene Transduktion sowie die Infektion mit vermehrungsfähigem Ebolavirus verstärken (GRAMBERG et al. 2005). Ob endogen

exprimiertes LSECtin die Ebolavirus Infektion von Zielzellen fördert, ist gegenwärtig unklar.

hMGL (humanes Makrophagen Galactose/ N-acetylgalactosamin-spezifisches C-Typ Lektin; CD301, DC-ASGPR, CLEC10A) bindet an Galactose und N-Acetylgalactosamin und wird auf unreifen dendritischen Zellen und Makrophagenvorläuferzellen exprimiert (HIGASHI et al. 2002a, HIGASHI et al. 2002b). Die gerichtete Expression von hMGL auf K562 Zellen (einer myeloischen Leukämie-Zelllinie) verstärkt die Transduktion mit EBOV-GP-tragenden Vektoren und die Infektion mit vermehrungsfähigen Ebolaviren. Die Verstärkung der Infektion durch hMGL ist abhängig von der Präsenz der Muzin-ähnlichen Domäne in EBOV-GP, während diese Domäne für die Verstärkung der Infektion durch DC-SIGN und DC-SIGNR verzichtbar ist (TAKADA 2004). Die Nutzung von hMGL für den Zelleintritt hängt wahrscheinlich vom Ebolavirus Subtyp ab: Die hMGL-Expression verstärkt den Eintritt von EBOV-GP aber nicht RESTV-GP-tragenden Vektoren und der Austausch der GP2-Untereinheit zwischen diesen beiden Spezies konnte diesen Effekt umkehren (USAMI et al. 2011).

MBL (Mannose-bindendes Lektin), ebenfalls ein C-Typ Lektin, bindet Mannose, Fucose, Glucose, ManNac (N-Acetyl-D-mannosamin) und GlcNac. Galactose wird nicht gebunden. Es wird in Hepatozyten synthetisiert und ist als lösliches Serumprotein zuständig für die Komplementaktivierung über den Lektinweg. Dies konnte für unterschiedlichste Pathogene gezeigt werden, beispielsweise für verschiedene Viren, u.a. HIV (HOLMSKOV et al. 2003, HAURUM et al. 1993). Im Fall von Ebolavirus wurde gezeigt, dass GP-tragende Vektoren rekombinantes MBL binden, was die Interaktion mit DC-SIGN blockiert. Die Bindung der Vektoren an MBL war Komplement-abhängig und führte zu einer Neutralisation der Vektoren (JI et al. 2005). Eine andere Studie demonstrierte eine gesteigerte Infektiosität von GP-tragenden Vektoren in Anwesenheit von MBL in Serum mit geringem Komplementgehalt (BRUDNER et al. 2013). Diese Studie zeigte auch, dass das Komplement-bindende Protein C1QBP und das C-Typ-Lektin Dectin-2 den GP-getriebenen Eintritt beeinflussen.

Ein weiteres C-Typ Lektin, das im Zusammenhang mit Ebolavirus bislang noch nicht untersucht wurde, ist der **Mannoserezeptor** (CD206, CLEC13D, CLEC13DL, MRC1L1). Ebenso wie die bereits erwähnten Lektine bindet es Mannose, Fucose und GlcNac neben weiteren Liganden. Es wird vorrangig auf Untergruppen von Makrophagen, darunter Monozyten-abgeleiteten Makrophagen (SHEPHERD et al. 1982), dendritischen Zellen und nichtvaskulären Endothelzellen exprimiert. Neben der Förderung der Antigenpräsentation, Phagozytose endogener Moleküle und zellulärer Aktivierung wurde auch eine Bindung an virale Glykoproteine wie HIV gp120 und andere Pathogene gezeigt (TURVILLE et al. 2002, MARTINEZ-POMARES 2012). Ähnlich wie der Mannoserezeptor ist auch **CLEC5A** (*C-type lectin domain family 5, member A*; MDL-1) bisher noch nicht im Zusammenhang mit Ebolaviren untersucht worden. Es handelt sich auch hierbei um ein C-Typ-Lektin, das auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (BAKKER et al. 1999). Die Signalwirkung von CLEC5A in der Dengue-Virusinfektion kann durch Mannan und Fucose inhibiert werden (CHEN et al. 2008). Ähnlich wie bei der Dengue-Virusinfektion fördert CLEC5A auch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in der Infektion mit dem Japanischen Enzephalitis Virus (CHEN et al. 2012).

Es wird deutlich, dass die gerichtete Expression von Lektinen den GP-getriebenen Zelleintritt deutlich verstärken kann. Allerdings ist häufig unklar, ob wichtige Zielzellen der Ebolavirus-Infektion die entsprechenden Lektine exprimieren und ob die Expressionsstärke ausreicht, die Infektion zu verstärken.

TIM-Familie

Als weiterer Anheftungsfaktor gilt der Phosphatidylserinrezeptor **TIM-1**. Die TIM (*T cell immunoglobulin and mucin domain gene*) Familie wird beim Menschen durch TIM-1, TIM-3 und TIM-4 repräsentiert. Die TIM-Proteine bestehen aus einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne (IgV), einer Muzindomäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Region. Die IgV-Domäne enthält ein Motiv zur Bindung von Phosphatidylserin (PtdSer), das auf der Außenseite der Membran apoptotischer Zellen exprimiert wird und die Phagozytose der apoptotischen Zellen auslöst. Die zytoplasmatische Region enthält bei TIM-1 und TIM-3 ein Motiv für die

Tyrosinphosphorylierung, das mit intrazellulären Signalkaskaden in Verbindung steht (FREEMAN et al. 2010).

TIM-1 wird von Mastzellen, Typ-2-T-Helferzellen (T_H2) (UMETSU et al. 2005) und tubulären Nierenepithelzellen (ICHIMURA et al. 2008) exprimiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TIM-1 auch auf respiratorischen Epithelzellen und basal auf der Kornea sowie der Konjunktiva vorhanden ist (KONDRATOWICZ et al. 2011).

Neben seiner Bindung an Phosphatidylserin (PtdSer) konnte TIM-1 auch als Rezeptor des Hepatitis A Virus (HAVCR1 = *Hepatitis A virus cellular receptor 1*) identifiziert werden (FEIGELSTOCK et al. 1998, KAPLAN et al. 1996). In diesem Zusammenhang wird TIM-1 assoziiert mit der Entstehung atopischer Erkrankungen (MCINTIRE et al. 2003). Die Erkennung von PtdSer durch TIM-1 aktiviert T-Zellen und induziert die Zytokinproduktion in Makrophagen (HEIN u. WOODS 2007). Auch eine Interaktion zwischen TIM-1 und TIM-4 konnte gezeigt werden ebenso wie eine Bindung von oxidiertem LDL (MEYERS et al. 2005, KONDRATOWICZ et al. 2011, ICHIMURA et al. 2008). Ähnlich wie TIM-1 reguliert TIM-3 die Aktivierung von T-Zellen und begünstigt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (ANDERSON et al. 2007). TIM-3 wird exprimiert auf Untergruppen von T-Zellen (T_H1 , T_c1), dendritischen Zellen und Makrophagen sowie auf respiratorischem Epithel (KONDRATOWICZ et al. 2011) und in geringeren Mengen auf Monozyten (ANDERSON et al. 2007). Durch Bindung von PtdSer konnte eine Aufnahme apoptotischer Zellen durch Untergruppen von Makrophagen und dendritischen Zellen mithilfe von TIM-3 gezeigt werden (NAKAYAMA et al. 2009). TIM-4 wird lediglich auf Untergruppen dendritischer Zellen und Makrophagen exprimiert und vermittelt ebenfalls über die Bindung an PtdSer die Phagozytose apoptotischer Zellen (MIYANISHI et al. 2007, KOBAYASHI et al. 2007).

Eine Relevanz von TIM-1 für den Zelleintritt von Ebolaviren wurde erstmals durch Kondratowicz und Kollegen im Jahr 2011 berichtet (KONDRATOWICZ et al. 2011). siRNA-*knockdown* von TIM-1 reduzierte den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren in Zelllinien, während die transiente Expression von TIM-1 den Eintritt erhöhte. Koimmunopräzipitationsexperimente zeigten außerdem, dass TIM-1 an

EBOV-GP bindet. Durch Mutation der RBD in EBOV-GP konnte die Bindung von GP an TIM-1 aufgehoben werden (KONDRATOWICZ et al. 2011). TIM-1 ist daher als Anheftungsfaktor für Ebolaviren anzusehen.

Das initial postulierte Konzept, dass exogenes und endogenes TIM-1 und TIM-4 die EBOV-GP getriebene Infektion verstärken, in dem sie an das virale GP binden (KONDRATOWICZ et al. 2011, MOLLER-TANK et al. 2013), wurde durch nachfolgende Arbeiten in Frage gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von PtdSer in der viralen Membran durch TIM-1 auf der Wirtszelloberfläche für die TIM-1-vermittelte Verstärkung des Viruseintritts essentiell ist (JEMIELITY et al. 2013). So wurden TIM-1 Mutanten untersucht, die nicht mehr in der Lage sind PtdSer zu binden. Diese Mutanten konnten im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr den EBOV-GP-vermittelten Eintritt verstärken. Eine zentrale Rolle der PtdSer-Erkennung in der TIM-1-vermittelten Verstärkung der Ebolavirus-Infektion wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass der GP-vermittelte Eintritt in 293T Zellen und in peritonealen Mausmakrophagen durch Zugaben von PtdSer inhibiert wird (JEMIELITY et al. 2013). Darüber hinaus konnten spezifische Reste der PtdSer-bindenden Domäne von TIM-1 als essentiell für die Verstärkung des Viruseintritts identifiziert werden (MOLLER-TANK et al. 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TIM-1 die Internalisierung von Ebolavirus-ähnlichen Partikel unabhängig von der Expression von GP fördert (JEMIELITY et al. 2013). Des Weiteren scheint TIM-1 auch eine Verstärkung des Eintritts anderer Viren zu vermitteln, so konnte auch ein Effekt auf Ross River Virus-GP und Sindbis Virus-GP gezeigt werden (JEMIELITY et al. 2013). Im Gegensatz dazu scheint ein anderer PtdSer-Rezeptor (RAGE = *receptor for advance glycation end products*), der nicht zur TIM-Familie gehört, den EBOV-GP vermittelten Eintritt nicht zu verstärken (MOLLER-TANK et al. 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl bestimmte Lektine als auch TIM-1 und TIM-4 den EBOV-GP-getriebenen Zelleintritt verstärken können. Allerdings werden diese Faktoren auf zahlreichen Zielzellen der Ebolavirus-Infektion nicht exprimiert und es muss angenommen werden, dass die Viren weitere Anheftungsfaktoren für die Infektion nutzen können.

2.6.3 Signalmoleküle

Die Signalmoleküle unterscheiden sich von den Anheftungsfaktoren bezüglich des Eintritts von Ebolaviren, indem zu allen im Folgenden erwähnten Molekülen keine direkte Interaktion mit GP nachgewiesen werden konnte.

TAM Rezeptoren-Tyrosinkinasen

Die Rezeptoren **Tyros3**, **Axl**, und **Mer** bilden innerhalb der Rezeptor-Tyrosinkinasen eine eigene Gruppe, auch TAM-Rezeptoren genannt. Sie bestehen aus je zwei extrazellulären Ig-ähnlichen und Fibronectin III Domänen, die über eine Transmembrandomäne mit der intrazellulären Kinasedomäne verbunden sind. Sie sind ubiquitär exprimiert, variieren aber in ihrer Expressionsstärke. Unter anderem werden sie auch auf Makrophagen, dendritischen Zellen und NK-Zellen exprimiert, dagegen nicht auf Lymphozyten (NEUBAUER et al. 1994, MARK et al. 1994, GRAHAM et al. 1994, CROSIER et al. 1994). Alle drei Rezeptoren können parallel exprimiert werden (beispielsweise in Sertolizellen (LU et al. 1999), Purkinje Zellen in Ratten (PRIETO et al. 2000), murinen Peritonealmakrophagen (SEITZ et al. 2007), Thrombozyten (ANGELILLO-SCHERRER et al. 2001)), allerdings gibt es auch Hinweise, dass Mer im Vergleich zu Axl und Tyros3 vermehrt auf induzierten THP1 Zellen anzutreffen ist (LIAO et al. 2009). Die Expression der verschiedenen TAM-Rezeptoren scheint abhängig von weiteren Faktoren zu sein. So kann die Expression von Axl in Monozyten mit IFN α stimuliert werden, ebenso scheint die Mer Expression abhängig von der Stimulation mit M-CSF in Makrophagen zu sein (NEUBAUER et al. 1994, ZIZZO et al. 2012).

Alle TAM-Rezeptoren interagieren mit Gas6 oder Protein S, die an PtdSer auf der Oberfläche apoptotischer Zellen binden (LINGER et al. 2008, LEMKE 2013). Diese Ligand-Rezeptor-Interaktion führt zur Dimerisierung des Rezeptors und löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die die Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Makrophagen induziert (SAVILL et al. 2002, LEMKE u. ROTHLIN 2008, LINGER et al. 2008, WU et al. 2005). Bedingt durch die ubiquitäre Expression der TAM-Rezeptoren ergeben sich vielfältige Funktionen, die über den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) –AKT Signalweg vermittelt werden (SHANKAR et al. 2003, SHANKAR

et al. 2006, ANGELILLO-SCHERRER et al. 2005). So ist die Aggregation von Thrombozyten abhängig von der Expression aller TAM-Rezeptoren (ANGELILLO-SCHERRER et al. 2005). Daneben sichern Axl und Mer auch das Überleben von normalen und Tumorzellen. Andere Signalwege vermitteln eine verminderte proinflammatorische Zytokinproduktion (LINGER et al. 2008).

Infolge einer cDNA Analyse einer Zelllinie, die für die Infektion mit Ebolavirus empfänglich ist, wurde die Familie der TAM-Rezeptoren als mögliche Eintrittsfaktoren identifiziert. Die transiente Expression der TAM-Rezeptoren auf einer Lymphozytenzelllinie ermöglichte den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren, wobei der Effekt durch Mer am Schwächsten war. Der Eintritt wurde sowohl durch Antikörper, Gas6 als auch lösliche TAM-Rezeptoren reduziert, wobei die Inhibition von Axl den größten Effekt auf den GP-vermittelten Eintritt hatte (SHIMOJIMA et al. 2006). Auch ein siRNA *knockdown* der Axl-Expression inhibierte den Eintritt von EBOV in eine Glioblastomzelllinie (HUNT et al. 2011). Verantwortlich für den Axl-vermittelten Zelleintritt scheint die Ig-Domäne zu sein, die Gas6 bindet. Deletionen im Bereich dieser Domäne führten zu einem verminderten EBOV-GP-vermittelten Eintritt (SHIMOJIMA et al. 2007).

Im Gegensatz dazu wurde durch nachfolgende Publikationen gezeigt, dass lösliches Axl den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren nicht inhibiert (BRINDLEY et al. 2011). Darüber hinaus konnte keine direkte Interaktion mit EBOV-GP nachgewiesen werden (BRINDLEY et al. 2011), allerdings gibt es einen Einfluss der TAM-Rezeptoren auf den Eintritt von infektiösem Ebolavirus (SHIMOJIMA et al. 2006, HUNT et al. 2011). So ermöglichte die gerichtete Expression von Axl und Tyro3 die Infektion einer T-Zelllinie, ebenso zeigte der siRNA *knockdown* von Axl eine verminderte Infektion einer Glioblastomzelllinie. Dieser Einfluss der TAM-Rezeptoren scheint abhängig von der getesteten Zelllinie zu sein (SHIMOJIMA et al. 2006) und ihr Beitrag zur Infektion von Makrophagen ist gegenwärtig unklar. Ein verbesserter Eintritt von Ebolaviren durch Expression von Axl könnte durch die Signal-induzierte Aktivierung der Makropinozytose erklärt werden. So scheint Makropinozytose durch siRNA *knockdown* von Axl nicht mehr die Transduktion mit EBOV-GP-tragenden Vektoren zu vermitteln (HUNT et al. 2011).

Integrine

Integrine sind Moleküle auf der Zelloberfläche mit einer breiten Expression. Sie bestehen aus einer großen α -Kette, die nicht-kovalent mit einer β -Kette verbunden ist. Insgesamt sind 18 α -Ketten und 8 β -Ketten bekannt, die 24 mögliche Heterodimere formen. Diese Ketten können unterteilt werden in Laminin-, Kollagen-, RGD- und Leukozyten-spezifische Rezeptoren (HYNES 2002).

Integrine binden an Komponenten der extrazellulären Matrix und vermitteln über PI(3)K die Zell-Zelladhäsion (KHWAJA et al. 1997). Daneben kontrollieren sie die Zelltranskription, -proliferation und Apoptose (HYNES 2002).

Im Rahmen des Eintritts von Ebolaviren konnte zunächst gezeigt werden, dass die Expression von EBOV-GP mit der Expression von β_1 und α_V Integrinen interferiert (TAKADA et al. 2000). Die Inkubation mit bestimmten β_1 Integrin-spezifischen Antikörpern reduzierte die EBOV-GP-getriebene Transduktion. Die Inkubation von rekombinanten heterodimeren Integrinen ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$) zeigte dagegen nur einen inhibierenden Effekt von $\alpha_5\beta_1$ auf den GP-vermittelten Eintritt, wohingegen $\alpha_V\beta_3$ nur geringgradig inhibierte. Insgesamt folgerten die Autoren daraus einen primär β_1 -Integrin vermittelten Einfluss auf den Eintritt von Ebolaviren (TAKADA et al. 2000).

Eine weitere Studie konnte mit Hilfe von CHO-Zellen einen stimulierenden Effekt der Expression von $\alpha_5\beta_1$ Integrin nachweisen. Dieser Effekt konnte nicht auf die Bindung von $\alpha_5\beta_1$ Integrin an EBOV-GP zurückgeführt werden oder auf eine Integrin-vermittelte Internalisierung von GP-tragenden Viren. Im Gegensatz dazu scheinen Integrine Prozesse zu modulieren, die nach der Aufnahme von Viren in Zellen vor der GP-getriebenen Membranfusion ablaufen (SCHORNBERG et al. 2009). Im Einklang mit diesen Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der endo-/lysosomalen Protease Cathepsin L, die das Glykoprotein der Ebolaviren aktiviert (SCHORNBERG et al. 2009)(siehe unten), in Zellen mit verminderter $\alpha_5\beta_1$ -Expression deutlich reduziert ist. Diese Aktivität von Cathepsin B scheint dagegen nicht beeinflusst zu sein (SCHORNBERG et al. 2009).

Insgesamt gibt es Hinweise darauf, dass die Integrine α_5 , α_V , α_4 und β_1 für den Eintritt von Ebolaviren in Zielzellen wichtig sind. Ihre Wirkung scheint wesentlich auf der Modulation der intrazellulären Signalkaskade zu beruhen.

Weitere mögliche Signalmoleküle

Der **Folatrezeptor α** (FR α , gp38) ist ein GPI-verankertes Glykoprotein, das zur Endozytose-vermittelten Folataufnahme beisteuert (KELEMEN 2006). Es wird auf Epithelzellen verschiedener Gewebe exprimiert, scheint aber insbesondere in Tumorzelllinien überexprimiert zu werden (WEITMAN et al. 1992).

Eine Rolle von FR α als Eintrittsfaktor für Ebolaviren wird kontrovers diskutiert. Zunächst wurde gezeigt, dass Antikörper gegen FR α und bovines Folat-bindendes Protein den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren verhindern können. Außerdem konnte eine Lymphozytenzelllinie (Jurkat), die nach cDNA-Eintrag positiv für FR α war, erfolgreich mit EBOV-GP-tragenden Vektoren transduziert werden (CHAN et al. 2001). In einer weiteren Studie wurde kein Einfluss von FR α -spezifischen Antikörpern auf die EBOV-GP getriebene Transduktion von Atemwegsepithelzellen festgestellt (SINN et al. 2003). Außerdem war die gerichtete Expression von FR α auf einer anderen Lymphozytenzelllinie nicht ausreichend, um den EBOV-GP-vermittelten Eintritt zu ermöglichen (SIMMONS et al. 2003b). Erklärt wurde dieses entgegengesetzte Ergebnis damit, dass in der ersten Publikation ein FR α -Derivat verwendet wurde, das nicht in der Form des nativen Proteins exprimiert werden kann (SIMMONS et al. 2003b, SINN et al. 2003). Insgesamt wird ein Einfluss von FR α auf den Eintritt von Ebolavirus als untergeordnet betrachtet.

Es wird deutlich, dass ein einzelner Rezeptor für Ebolaviren nicht bekannt ist. Auch der Weg der weiteren Prozessierung ist unklar. Dennoch gibt es Hinweise, dass Ebolaviren über den Weg der Makropinozytose in die Zelle aufgenommen werden.

2.6.4 Makropinozytose

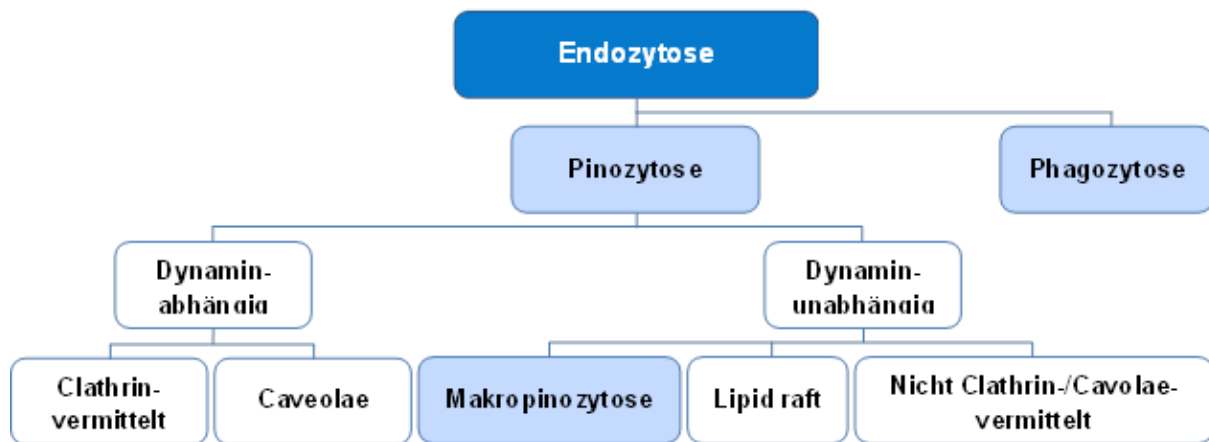


Abbildung 5: Übersicht über die Eintrittswege von Viren durch Aufnahme in zelluläre Vesikel

Nach der Bindung an einen oder mehrere Rezeptoren auf der Zelloberfläche muss das Virus in Zielzellen aufgenommen werden, um diese produktiv zu infizieren. Es wird vermutet, dass Ebolaviren über den Weg der Makropinozytose in die Zelle aufgenommen werden. Makropinozytose bezeichnet einen Endozytosevorgang (Abbildung 5), bei dem die Zellmembran durch unterschiedliche Stimuli zu Ausstülpungen wie Lamellipodien umorganisiert wird (MERCER u. HELENIUS 2009). Die Membranausstülpungen umschließen unspezifisch eine große Flüssigkeitsmenge, in der Partikel vorhanden sein können, wodurch ein Makropinosom entsteht. Dieses Makropinosom durchwandert einen Reifungsprozess inklusive einer Ansäuerung, bevor es mit Lysosomen fusioniert. Insgesamt handelt es sich um einen Dynamin-unabhängigen Prozess (siehe Abbildung 5).

Partikel sind nicht essentiell für die Aufnahme in die Zelle, im Gegensatz zur Phagozytose. Die Makropinozytose ist ebenso wie die Phagozytose ein transienter Aktin-abhängiger Vorgang, der allerdings auf der gesamten Membranoberfläche auftritt. Er wird durch Wachstumsfaktoren aber auch durch apoptotische Körperchen, nekrotische Zellen, Bakterien und Viren induziert. Zu letzteren zählen beispielsweise die reifen Virionen von Vaccinia Virus (MERCER u. HELENIUS 2008).

Um herauszufinden, ob ein Virus diesen Aufnahmemechanismus nutzt, müssen verschiedene Kriterien bestätigt werden. Ein Makropinozytose-abhängiges Virus sollte die **Membranausstülpungen** induzieren und eine transient **erhöhte Flüssigkeitsaufnahme** verursachen. Außerdem sollte es vermindert aufgenommen werden, wenn Inhibitoren gegen die **Aktinveränderungen** eingesetzt werden und abhängig sein von bestimmten **Rho GTPasen** (nicht RhoA), die die Membranveränderungen induzieren. Inhibitoren, die eine Ansäuerung während der Reifung des Makropinosoms verhindern (**Na⁺/H⁺-Austauscher**), sollten ebenso einen Eintritt verhindern wie Inhibitoren, die gegen bestimmte **Kinasen** (Bsp. PI(3)K) und Strukturen des Zytoskeletts gerichtet sind (MERCER u. HELENIUS 2009).

Die Induktion von **Membranausstülpungen** durch GP-tragende Vektoren und infektiöses Ebolavirus konnte sowohl durch Immunofluoreszenz-Analysen als auch durch Elektronenmikroskopie von Vero- und HeLa-Zellen nachgewiesen werden (NANBO et al. 2010, ALEKSANDROWICZ et al. 2011). Um eine erhöhte **Flüssigkeitsaufnahme** feststellen zu können, wird die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Dextran in Anwesenheit von Ebolavirus-ähnlichen Partikeln (VLPs) oder rekombinantem Ebolavirus gemessen. Diese Technik bestätigte die erhöhte Flüssigkeitsaufnahme in Vero-/ HeLa-Zellen (NANBO et al. 2010, MULHERKAR et al. 2011, ALEKSANDROWICZ et al. 2011, SAEED et al. 2010), was sowohl via FACS als auch konfokal gemessen wurde.

Latrunculin A, Cytochalasin B und Cytochalasin D sind Inhibitoren der **Aktinpolymerisierung**, einem Prozess, der für Makropinozytose essentiell ist (MERCER u. HELENIUS 2009). Diese Inhibitoren blockieren sowohl den GP-vermittelten Eintritt (MULHERKAR et al. 2011, YONEZAWA et al. 2005) als auch die Internalisierung (NANBO et al. 2010, MULHERKAR et al. 2011). Der Vergleich von Axl-exprimierenden und Axl-*knockout* Zellen ergab, dass der Inhibitor Cytochalasin B (neben anderen Makropinozytose-Inhibitoren wie EIPA und PI3K-Inhibitoren) den Eintritt GP-tragender Vektoren nur in Anwesenheit von Axl verhindern kann. Daraus schlossen die Autoren, dass Axl die Makropinozytose induzieren kann (HUNT et al. 2011).

RhoGTPasen sind Moleküle, die intrazelluläre Aktinprozesse regulieren. Zu ihnen zählen beispielsweise Rac1, CDC42, RhoB und RhoC. Einen Beitrag dieser RhoGTPasen zum GP-vermittelten Eintritt in Zielzellen konnte in verschiedenen Publikationen gezeigt werden (SAEED et al. 2008, NANBO et al. 2010, QUINN et al. 2009).

Der Einfluss des **Na⁺/H⁺-Austauschers** EIPA auf den Eintritt von Ebolaviren wurde intensiv untersucht. So wurden sowohl GP-tragende Vektoren als auch rekombinantes Ebolavirus am Eintrittsprozess gehindert (NANBO et al. 2010, ALEKSANDROWICZ et al. 2011, SAEED et al. 2010, KONDRATOWICZ et al. 2013), einschließlich Makrophagen (MULHERKAR et al. 2011). Die Inhibition der Infektion durch EIPA war sowohl unabhängig vom löslichen Lektin MBL als auch von der Tyrosinkinase Axl (HUNT et al. 2011, BRUDNER et al. 2013).

PI3Kinasen (PI3K) können durch Wortmannin und LY294002 inhibiert werden, was eine Signaltransduktion im Rahmen des PI3K-Akt-Signalwegs verhindert. Eine Inhibition des Eintritts konnte anhand von EBOV-GP-tragenden Vektoren und rekombinantem Ebolavirus gezeigt werden (NANBO et al. 2010, ALEKSANDROWICZ et al. 2011, SAEED et al. 2008). Eine Infektion mit inaktiviertem Ebolavirus verursachte ebenso eine Akt-Phosphorylierung, was indirekt für eine Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs spricht (SAEED et al. 2008).

Neben den genannten Faktoren wurden weitere Moleküle in Betracht gezogen, die im Rahmen der intrazellulären Signalweiterleitung während der Makropinozytose eine Rolle spielen könnten. Dazu zählen die Phospholipase C (HUNT et al. 2011), die Proteinkinase C (NANBO et al. 2010) und die AMP-aktivierte Protein Kinase (AMPK) (KONDRATOWICZ et al. 2013). Auch die Aufnahme in Makropinosomen konnte gezeigt werden, indem ein Makropinosom-spezifisches Molekül (Sorting Nexin 5) mit Ebola-VLPs kolokalisierte (NANBO et al. 2010).

2.6.5 Weitere Endozytosevorgänge

Intensiv untersucht wurden neben diesem Dynamin-unabhängigen Eintritt auch die Dynamin-abhängigen Endozytosevorgänge. Zu den Dynamin-abhängigen Vorgängen zählen der Caveolae-abhängige und der Clathrin-vermittelte Eintritt. Eine

Dynamamin-Abhängigkeit konnte im Rahmen von Inhibitionsstudien gezeigt werden, allerdings widersprechen sich die Ergebnisse. Dies kann auf die unterschiedlichen verwendeten Zelllinien zurückgeführt werden (HUNT et al. 2011, MULHERKAR et al. 2011, NANBO et al. 2010). Insbesondere der Dynamamin-abhängige Eintritt via **Caveolae** wird kontrovers diskutiert, da in einigen Fällen weder eine Kolokalisation mit VLPs noch eine verminderte Infektion nach *knockdown* gezeigt werden konnte (ALEKSANDROWICZ et al. 2011, NANBO et al. 2010). Der Eintritt via **Clathrin** konnte nachgewiesen werden (MULHERKAR et al. 2011, ALEKSANDROWICZ et al. 2011, HUNT et al. 2011, SANCHEZ 2007, BHATTACHARYYA et al. 2010), wobei auch hier ein Zelltyp-spezifischer Mechanismus vermutet wird (NANBO et al. 2010, HUNT et al. 2011). In Anbetracht der Ergebnisse, die für einen Eintritt via Makropinozytose sprechen, wurde in einer Studie die Theorie aufgestellt, dass Ebolaviren eine nicht klassische Dynamamin-abhängige Makropinozytose nutzen (MULHERKAR et al. 2011).

Die Überlegung, dass Makropinozytose durch Ebolaviren genutzt wird, konnte durch eine Studie bestätigt werden, die den Einfluss von sauren Sphingomyelinasen (ASMase) untersuchte (MILLER et al. 2012b). Neben positiven Kolokalisationsstudien zwischen Sphingomyelin (SM), der ASMase und EBOV-GP tragenden Vektoren, zeigte sich eine verminderte Infektion mit replikationsfähigem EBOV in Abwesenheit von SM oder ASMase (MILLER et al. 2012b). Dies verstärkt die Theorie des Eintritts via Makropinozytose, da die Modifikation des SMs durch die ASMase zur Formation eines Makropinosoms beiträgt (ZHA et al. 1998). Daneben bestehen sowohl Interaktionen zwischen SM, der ASMase und DC-SIGN, als auch zwischen SM, ASMase und NPC1 (AVOTA et al. 2011, DEVLIN et al. 2010, KOIVUSALO et al. 2007, MILLER et al. 2012b).

Insgesamt verdichten sich somit die Hinweise, dass Ebolaviren über den Weg der Makropinozytose oder einen bisher nicht bekannten, sehr ähnlichen Weg in die Zelle aufgenommen werden.

2.6.6 Cathepsine

Nach dem Eintritt in Wirtszellendosomen wird das GP durch die pH-abhängigen endo-/lysosomalen Cysteinproteasen Cathepsin B (CatB) und L (CatL) prozessiert (CHANDRAN et al. 2005). Im Rahmen der Prozessierung werden die Glykankappe und die Muzin-ähnliche Domäne entfernt, sodass die Rezeptor-Bindungsdomäne exponiert wird (CHANDRAN et al. 2005, LEE et al. 2008, HOOD et al. 2010).

Eine initiale Arbeit zeigte, dass CatB eine zentrale Rolle beim Zelleintritt von Ebolaviren spielt, während die Aktivität von CatL nur eine untergeordnete Bedeutung hat (CHANDRAN et al. 2005). Allerdings steigerte die gerichtete Ko-Expression von CatL und CatB in CatB/CatL-*knockout*-Mauszellen den GP-getriebenen Eintritt stärker als die Expression von CatB allein (CHANDRAN et al. 2005). Die Beobachtung, dass das Zusammenspiel von CatB und CatL für den effizienten GP-getriebenen Eintritt erforderlich ist, konnte durch siRNA *knockdown*-Experimente bestätigt werden (SCHORNBERG 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass sowohl rekombinantes CatB als auch CatL in der Lage sind, EBOV-GP zu prozessieren (CHANDRAN et al. 2005, HOOD et al. 2010, WONG et al. 2010).

Dennoch besteht die Möglichkeit, dass weitere Cysteinproteasen den Eintritt von Ebolaviren in Zielzellen beeinflussen. Dies konnte durch GP-Mutanten gezeigt werden, die nicht durch CatB-Inhibitoren, jedoch durch einen Proteaseinhibitor mit breitem Wirtsspektrum blockiert wurden (WONG et al. 2010). Ebenso scheinen die verschiedenen Ebolavirusspezies unterschiedlich auf CatB und CatL Aktivität angewiesen zu sein (MARZI et al. 2012, GNIRSS et al. 2012).

Auf eine mögliche Interaktion zwischen CatL und Integrinen wurde bereits verwiesen.

2.6.7 NPC1

NPC1, das Niemann Pick C1 Protein, ist ein Transmembranprotein, das die Membran des späten Endosoms und Lysosoms mehrfach durchzieht. Bekannt ist es durch die gleichnamige lysosomale Speicherkrankheit, die durch Mutationen von NPC1 hervorgerufen wird (SCOTT u. IOANNOU 2004).

NPC1 wird ubiquitär exprimiert. Als Cholesteroltransporter fördert es wahrscheinlich den Transport von LDL (*low-density lipoprotein*)-Cholesterol aus dem Endo-/Lysosom ins Zytoplasma. Von dort gelangt es möglicherweise mithilfe des SNARE-Komplexes durch vesikulären Transport zum Golgi-Apparat, von wo es anschließend zur Plasmamembran gelangt und eingebaut wird oder im ER weiter prozessiert wird (URANO et al. 2008). Möglicherweise geschieht dies im Zusammenspiel mit NPC2 (VANCE u. PEAKE 2011).

Eine Rolle von NPC1 beim Eintritt von Ebolaviren in Zellen konnte festgestellt werden, indem Zellen charakterisiert wurden, die aufgrund von genetischen Defekten nicht mehr empfänglich für die EBOV-GP-getriebene Infektion waren (CARETTE et al. 2011). Neben dem bekannten Faktor CatB konnten auch der sogenannte HOPS-Komplex und NPC1 über diese Methode als Faktoren identifiziert werden, die für den Eintritt von Ebolaviren in Wirtszellen wichtig sind. Der HOPS-Komplex ist ein Zusammenschluss mehrerer Proteine, der die Fusion von Endosom und Lysosom fördert. Zellen ohne funktionellen HOPS-Komplex konnten ebenso wenig mit EBOV-GP-tragenden Vektoren transduziert werden wie NPC1-defiziente Zellen. Ebola-resistente Zellen, unter anderem Reptilienzellen, konnten durch Expression von humanem NPC1 empfänglich für Ebolavirus gemacht werden (CARETTE et al. 2011, COTE et al. 2011, MILLER et al. 2012a). Monozyten, die *in vitro* weniger empfänglich sind als dendritische Zellen und Makrophagen, zeigen eine geringere Expression von NPC1. Auch diese Zellen waren durch Überexpression von NPC1 permissiver für Ebola-VLPs (MARTINEZ et al. 2013). Versuche mit *knockout* Mäusen zeigten schließlich, dass NPC1 für die Ausbreitung von Ebolaviren im Wirt wichtig ist: Während Wildtyp-Mäuse der Ebolavirusinfektion erlagen, waren NPC1-*knockout*-Mäuse weitgehend resistent und überlebten (CARETTE et al. 2011).

Untersuchungen zur Funktion von NPC1 ergaben, dass es den Eintrittsprozess von Ebolavirus nach der Prozessierung von GP durch CatB/CatL und vor der Fusion beeinflusst. So bindet lediglich proteolytisch gespaltenes GP, nicht aber ungespaltenes GP an NPC1 (COTE et al. 2011). Durch Mutationsstudien konnte eine interne Schleifenstruktur in NPC1, die Domäne C, als Interaktionspartner der viralen Rezeptorbindungsdomäne identifiziert werden (MILLER et al. 2012a, KRISHNAN et

al. 2012). Diese Domäne bindet Cholesterol nicht, ist aber dennoch erforderlich für den Transport von lysosomalem Cholesterol (MILLER et al. 2012a). Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Resistenz von NPC1-negativen Zellen gegenüber der Ebolavirus-Infektion auf einen defekten Cholesteroltransport oder eine reduzierte Aufnahme von Viren durch Makropinozytose zurückzuführen ist (COTE et al. 2011, CARETTE et al. 2011).

Die zentrale Bedeutung von NPC1 für den Eintritt von Ebolaviren in Wirtszellen konnte auch durch den Einsatz von niedermolekularen Inhibitoren gezeigt werden: Imipramin und U18666A (COTE et al. 2011) inhibierten den GP-getriebenen Eintritt in Zelllinien und primäre dendritische Zellen (CARETTE et al. 2011).

Die Inhibition des GP-getriebenen Eintritts durch U18666A ist nicht auf eine Interaktion mit der GP-Bindung zurückzuführen (SHOEMAKER et al. 2013, COTE et al. 2011), der Inhibitor scheint aber dennoch einen NPC-abhängigen Schritt zu beeinflussen (SHOEMAKER et al. 2013). So besteht die Möglichkeit, dass U18666A mit einem Faktor interagiert, der von NPC1 reguliert wird, beispielsweise die bereits erwähnte saure Sphingomyelinase (ASMase) (SHOEMAKER et al. 2013). Die Beobachtung, dass siRNA-*knockdown* von ASMase die GP-getriebene Infektion von HeLa-Zellen nicht reduziert, spricht allerdings dagegen (COTE et al. 2011). Zusätzlich zu den genannten Inhibitoren konnten weitere Substanzen identifiziert werden, die durch Interaktion mit NPC1 den Eintritt von Ebolaviren verhindern können (COTE et al. 2011, LEE et al. 2013).

Im Gegensatz dazu zeigten die strukturell und funktional verwandten Proteine NPC1L1 oder NPC2 keinen Einfluss auf den Eintritt von Ebolaviren (MILLER et al. 2012a, CARETTE et al. 2011).

Damit ist NPC1 das erste Molekül, dessen Bindung an GP essentiell für den Zelleintritt aller Ebolavirus-Spezies ist (COTE et al. 2011).

2.6.8 Eintritt von Ebolavirus in Makrophagen

Die beschriebenen Anheftungsfaktoren und Signalmoleküle sind bisher hauptsächlich in Zelllinien statt in primären Zellkulturen analysiert worden. Der Eintrittsprozess von Ebolaviren in Zellen wie Monozyten, Makrophagen und

dendritische Zellen ist bisher wenig untersucht worden, obwohl es sich hierbei um die wichtigsten Zielzellen handelt. Monozyten sind *in vitro* deutlich schlechter mit EBOV-GP-tragenden Vektoren transduzierbar als die aus Monozyten differenzierten Makrophagen (YONEZAWA et al. 2005, MARTINEZ et al. 2013, DUBE et al. 2010, DUBE et al. 2008). Replikationsfähiges Ebolavirus zeigte diesen Effekt dagegen weniger ausgeprägt (STROHER 2001).

Analysen des Lektins DC-SIGN ergaben, dass es nach Transduktion in primäre Makrophagen die Infektion mit Ebolavirus um ein Sechsfaches steigerte (SIMMONS et al. 2003a). In Anwesenheit von Antikörpern gegen DC-SIGN und LSECtin war die Bindung von GP1 auf primären dendritischen Zellen deutlich vermindert (ALVAREZ et al. 2002, DOMINGUEZ-SOTO et al. 2007). Auf induzierten THP-1 Zellen, einem Zellkulturmodell für Makrophagen, und primären Makrophagen konnte das Lektin MBL signifikant die Infektion mit EBOV-GP-tragenden Vektoren erhöhen. Der Inhibitor Mannan hemmte den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren in induzierten THP-1 Zellen in Anwesenheit von nativem MBL (BRUDNER et al. 2013). Die Rolle von TIM wurde auf peritonealen Mausmakrophagen indirekt untersucht, indem gezeigt wurde, dass PtdSer einen Einfluss auf den Eintritt von Ebola-VLP hat (JEMIELITY et al. 2013).

Der Internalisierungsprozess wurde anhand des Einflusses von Inhibitoren gegen Dynamamin (Dynasore) und den Na⁺/H⁺-Austauscher (EIPA) untersucht. Beide Inhibitoren waren in der Lage, den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren auf primären Makrophagen zu hemmen (MULHERKAR et al. 2011). Dies gilt auch für einen Inhibitor gegen die AMPK (KONDRATOWICZ et al. 2013).

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder dendritischen Zellen scheint die Infektiosität mit Ebolavirus zu steigern (MARTINEZ et al. 2013). Auf mRNA-Ebene geht die Differenzierung einher mit einer 10fach gesteigerten Expression von Cathepsin B und NPC1. Eine Cathepsin B-Abhängigkeit konnte anhand von Inhibitoren auf dendritischen Zellen und primären Makrophagen gezeigt werden (MARTINEZ et al. 2010, GNIRSS et al. 2012). Während undifferenzierte THP-1-Zellen sich kaum mit VLP infizieren ließen, konnte dieser Effekt umgekehrt

werden durch die Expression von NPC1. Eine Relevanz von NPC1 für den Eintritt in Makrophagen wurde unterstrichen, indem eine Ebola-Mutante, die nicht in der Lage ist, NPC1 zu binden, einen deutlich verminderten Eintritt in humane Makrophagen aufwies (MARTINEZ et al. 2013).

Insgesamt wird deutlich, wie wenig über den Eintrittsprozess von Ebolaviren insbesondere in primäre Makrophagen bekannt ist. Welche Anheftungsfaktoren und Signalmoleküle tatsächlich relevant sind für den Eintritt in Makrophagen galt es im Rahmen dieser Arbeit herauszufinden.

2.7 Apoptoseerkennung

2.7.1 Ebolavirus und Apoptose

Betrachtet man die Funktionen und Liganden der beschriebenen Anheftungsfaktoren und Signalmoleküle, die in den Eintritt von Ebolaviren involviert sind, stößt man auf eine Gemeinsamkeit: ein Großteil ist an der Erkennung von apoptotischen Zellen beteiligt. Dies gilt sowohl für die TIM-Familie als auch die TAM-Rezeptoren. Auch das Lektin ASGPR1 wurde in diesem Zusammenhang erwähnt (DINI et al. 1992), ist aber lediglich auf Hepatozyten vorhanden.

TIM-1 erkennt PtdSer, das im Rahmen der Apoptose von der inneren Zellmembran auf die Oberfläche transportiert wird. TIM-1 wird allerdings, im Gegensatz zu TIM-4, nicht auf den primären Zielzellen von Ebolaviren, den Makrophagen, exprimiert. Eine Erkennung von PtdSer in der Virusmembran, das durch Budding aus apoptotischen Zellen stammt, wurde bereits erläutert.

Bei den TAM-Rezeptoren scheint insbesondere Mer den Abbau apoptotischer Zellen durch Makrophagen zu fördern (SCOTT et al. 2001), indem es apoptotische Zellen mithilfe von Gas6 erkennt (SAVILL et al. 2002, NAGATA et al. 1996, SATHER et al. 2007).

Integrine, genauer $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine, erkennen apoptotische Zellen über einen ähnlichen Mechanismus. Antikörper gegen sowohl die α -Kette α_v als auch gegen die β -Kette β_3 können die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen inhibieren (SAVILL et al. 1990). Die Bindung apoptotischer Zellen

erfolgt mithilfe des Proteins MFG-E8, das PtdSer bindet (HANAYAMA et al. 2002). MFG-E8 bindet anschließend spezifisch an Integrin $\alpha_V\beta_3$ auf Makrophagen und fördert die Aufnahme der apoptotischen Zellen. Auch die Bindung von Thrombospondin-1 an $\alpha_V\beta_3$ in Zusammenarbeit mit CD36 erhöhte die Aufnahme apoptotischer Zellen (SAVILL et al. 1992, KRISPIN et al. 2006). Dendritische Zellen nehmen apoptotische Zellen mithilfe des Integrins $\alpha_V\beta_5$ auf (ALBERT et al. 1998), während die β_2 -Integrine CR3 und CR4 (*complement receptor*) apoptotische Zellen nur über Komplementbindung erkennen können.

Der Einfluss von Mer und den erwähnten Integrinen auf den Eintritt von Ebola wurde bereits beschrieben, ist aber bezüglich der Relevanz auf Makrophagen noch nicht untersucht worden.

Benutzt Ebolavirus möglicherweise einen Mechanismus, der Rezeptor-unspezifisch ist und infiziert seine Zielzellen durch Mimikry apoptotischer Zellen? Diese Art von Mechanismus wird von Vaccinia Virus genutzt. Mithilfe der Analyse von Oberflächenlipiden konnte gezeigt werden, dass Vaccinia Virus über virales PtdSer aufgenommen wird. Diese Aufnahme erfolgt durch Induktion der Makropinozytose durch das Virus (MERCER u. HELENIUS 2008).

Um diesen Mechanismus im Rahmen des Eintritts von Ebolaviren zu untersuchen, muss zunächst geklärt werden, welche Moleküle zusätzlich zu den oben beschriebenen an der Erkennung apoptotischer Zellen durch primäre Zielzellen beteiligt sind.

2.7.2 Apoptose: Erkennung durch Makrophagen

Welche Moleküle werden ebenfalls auf Makrophagen exprimiert und sind in die Erkennung apoptotischer Zellen involviert? Zu diesen gehören beispielsweise *scavenger* Rezeptoren mit den Rezeptoren *scavenger receptor A*, CD36 und LOX-1. Neben den *scavenger* Rezeptoren ist auch das Glykoprotein CD14 an der Erkennung apoptotischer Zellen beteiligt (SAVILL et al. 2002). Weitere Rezeptoren, die der Erkennung apoptotischer Zellen dienen, sollen hier nur zur Vollständigkeit erwähnt werden. Zu diesen zählen CD68 (ein Scavenger Rezeptor der Klasse D) und der *ATP-binding cassette transporter*. Außerdem erkennt CD91 in Kombination mit

Calreticulin MBL-opsonierte apoptotische Zellen und fördert deren Aufnahme (ERWIG u. HENSON 2008, OGDEN et al. 2001, VANDIVIER et al. 2002, GARDAL et al. 2005, NAUTA et al. 2004).

Scavenger Rezeptoren gehören zu den *pattern-recognition* Rezeptoren. Sie bestehen aus den Klassen A-I und weiteren Klassen, die neben der Erkennung von modifiziertem LDL auch im Zusammenhang stehen mit der Erkennung und Entfernung von Pathogenen. Strukturell gibt es zwischen den Klassen keine Gemeinsamkeiten (CANTON et al. 2013). Interessanterweise wird auch infolge der Aufnahme von modifiziertem LDL durch TIM-1 spekuliert, diesen als weitere Klasse der Familie der *scavenger* Rezeptoren zuzuordnen (ICHIMURA et al. 2008, CANTON et al. 2013). Im Folgenden sollen *scavenger* Rezeptoren der Klassen A, B und E behandelt werden.

Scavenger Rezeptoren der Klasse A werden charakterisiert durch ihre Kollagendomäne. Hier soll nur auf einen Vertreter, den *scavenger receptor A*, eingegangen werden. *Scavenger receptor A* (SR-A, CD204, MSR1) ist ein membranständiges Glykoprotein, das in drei Isoformen exprimiert wird. Die Isoformen SR-AI und SR-AII sind Typ 2 Transmembranproteine und erscheinen in Form von Homotrimeren an der Zelloberfläche. Der extrazelluläre C-Terminus enthält bei SR-AI eine Cystein-reiche Domäne, die SR-AII fehlt, funktional wurden bisher aber keine Unterschiede festgestellt (BOWDISH u. GORDON 2009). SR-AIII verbleibt im ER und hat einen dominant-negativen Effekt auf die Aufnahme von modifiziertem LDL durch SR-AI und II (GOUGH et al. 1998).

SR-A wird auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, was den primären Zielzellen für Ebolaviren entspricht. Daneben tragen auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen und primäre Fibroblasten diesen Rezeptor (DEWITTE-ORR et al. 2010, STEPHEN et al. 2010). In Monozyten ist SR-A zunächst nicht detektierbar und kann erst nachgewiesen werden während der Differenzierung in Makrophagen (GOUGH et al. 1999).

Insgesamt bindet SR-A eine Vielzahl von Liganden, wobei insbesondere die Aufnahme nicht-opsonierter Pathogene eine Rolle zu spielen scheint. So wird neben

der Bindung modifizierten LDLs und polyanionischer Liganden auch die Aufnahme gram-positiver Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und apoptotischer Zellen gefördert (DUNNE et al. 1994). Die Internalisierung von Adenovirus 5 wird ebenfalls mit SR-A in Verbindung gebracht (HAWORTH et al. 1997). Außerdem wird SR-A in Zusammenhang gebracht mit atherosklerotischen Läsionen und der Adhäsion von Makrophagen in Zellkultur (FRASER et al. 1993). Eine Arbeitsgruppe testete shRNA gegen SR-A auf 293F Zellen und fand keine Interferenz mit EBOV-GP-tragenden Vektoren (BRUDNER et al. 2013).

Der Weg der Internalisierung erfolgt über die Phagozytose, aber auch Caveolae- und Clathrin-abhängige Wege konnten aufgezeigt werden (SULAHIAN et al. 2008, ZHU et al. 2011). Wie genau der Signalweg abläuft, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Mikrotubuli scheinen ebenso in die SR-A-vermittelte Phagozytose involviert zu sein wie die Proteinkinase C, Tyrosinkinasen, MAPK und PI3K (SULAHIAN et al. 2008). Ein Zusammenhang mit der PI3K wurde schon früher im Rahmen der Zelladhäsion hergestellt (CHOLEWA et al. 2010, NIKOLIC et al. 2007). Im Rahmen der Aufnahme apoptotischer Zellen wurde auch eine Assoziierung von SR-A und der Tyrosinkinase Mer beobachtet (TODT et al. 2008).

CD36 ist ein *scavenger* Rezeptor der Klasse B. Es wird unter anderem auf Makrophagen, dendritischen Zellen, Thrombozyten und Hepatozyten exprimiert (CANTON et al. 2013, SILVERSTEIN u. FEBBRAIO 2009). Neben seiner Funktion als Rezeptor für Thrombospondin dient es auch der Aufnahme von modifiziertem LDL und bindet PtdSer. In Verbindung mit Integrinen fördert es die Aufnahme apoptotischer Zellen in Makrophagen (SAVILL et al. 1992, KRISPIN et al. 2006). Über die Nutzung von CD36 als viralen Eintrittsrezeptor gibt es keine Erkenntnisse, im Rahmen eines shRNA-*knockdown* auf 293F Zellen ergab sich kein Zusammenhang mit EBOV-GP-vermitteltem Eintritt (BRUDNER et al. 2013).

LOX-1 (*lectin-like oxidized LDL receptor-1*) ist der einzige Vertreter der Klasse E *scavenger* Rezeptor. Er gehört zur Familie der C-Typ Lektine und wurde ursprünglich aus Endothelzellen isoliert (SAWAMURA et al. 1997). Außerdem wird er exprimiert auf differenzierten Makrophagen, Thrombozyten und glatten Muskelzellen der

Gefäße. Ähnlich wie SR-A wird er in Verbindung gebracht mit Atherosklerose (YOSHIMOTO et al. 2011). Neben der Bindung von oxidiertem und anderweitig modifiziertem LDL hat er ein Ligandenspektrum vergleichbar mit SR-A. Zusätzlich bindet es auch PtdSer. Neben der Erkennung apoptotischer Zellen wurde auch die LOX-1 vermittelte Phagozytose dieser Zellen beschrieben (OKA et al. 1998, PARLATO et al. 2010). Ein Zusammenhang mit einer Virusinfektion wurde im Rahmen einer möglichen Induktion der LOX-1 Expression durch Herpes simplex Virus 1 (HSV1) beschrieben (CHIRATHAWORN et al. 2004).

CD14 ist ein GPI-verankertes Glykoprotein. Es ist, wie die *scavenger* Rezeptoren, ein *pattern recognition* Rezeptor, der mit *toll-like* Rezeptoren interagiert (ZANONI u. GRANUCCI 2013). Ursprünglich angesehen als Monozyten- und Makrophagen-spezifisches Protein, ist heute ein größeres Expressionsspektrum bekannt. So tragen nicht nur Zellen des hämatopoetischen Systems CD14, sondern auch u.a. Endothelzellen und Epithelzellen (JERSMANN 2005). Neben seiner Funktion als LPS-Rezeptor ist er in der Lage, apoptotische Zellen zu erkennen und deren Aufnahme zu initiieren (DEVITT et al. 1998). Der Ligand auf der Oberfläche ist bisher nicht bekannt, ICAM-3 wird vorgeschlagen (MOFFATT et al. 1999). PtdSer ist zwar in der Lage zu binden, reicht aber nicht aus, um CD14-vermittelte Phagozytose zu fördern (DEVITT et al. 2003).

Die Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen wird insgesamt über eine Vielzahl von Rezeptoren vermittelt. Die Internalisierung dieser nicht-opsonierten Zellen scheint über einen Makropinozytose-ähnlichen Weg abzulaufen statt über eine klassische Phagozytose, wie es für die Aufnahme opsonierter Partikel üblich ist (ERWIG u. HENSON 2008). PtdSer ist in der Lage, Makropinozytose in Makrophagen zu induzieren (HOFFMANN 2001), dies scheint aber nicht der alleinige Weg der Internalisierung zu sein (ERWIG u. HENSON 2008, KRYSKO et al. 2006).

Diese Erkenntnisse sind weitere Hinweise darauf, dass sich auch Ebolaviren apoptotisches Mimikry zunutze machen könnten. Auf die Relevanz dieser Rezeptoren und deren möglicher Beitrag zum Eintritt von Ebolaviren in Makrophagen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

3 Ziele der Arbeit

Ebolaviren verursachen ein hämorrhagisches Fieber, das mit einer hohen Letalität einhergeht. Bekannte Virostatika sind nicht in der Lage, die virale Replikation zu inhibieren und gegenwärtig stehen weder Vakzine noch antivirale Therapien zur Verfügung.

Der Eintritt von Ebolaviren in Zellen ist der erste Schritt im viralen Vermehrungszyklus und die beteiligten viralen und zellulären Faktoren stellen potenzielle Angriffspunkte für die antivirale Therapie dar. Es ist bekannt, dass bestimmte Lektine, Integrine, TAM-Rezeptor-Tyrosinkinasen und Rezeptoren der TIM-Familie sowieso der Cholesteroltransporter NPC1 den Eintritt von Ebolaviren in Zellen fördern können. Diese Befunde wurden jedoch hauptsächlich mit Zelllinien erhoben. Makrophagen gehören zu den wichtigsten Zielzellen von Ebolaviren und werden zu allen Stadien der Infektion befallen. Welche Faktoren für den Ebolavirus-Eintritt in Makrophagen wichtig sind, war jedoch weitgehend unbekannt und sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

TAM-Rezeptor-Tyrosinkinasen, TIM-Proteine sowie bestimmte Integrine sind wesentlich an der Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen beteiligt und Ebolaviren könnten sich diesen Mechanismus in Form von apoptotischem Mimikry für den Zelleintritt zunutze machen. Es sollte daher insbesondere geklärt werden, ob Faktoren, die für die Beseitigung apoptotischer Zellen durch Makrophagen wichtig sind, auch die Aufnahme von Ebolaviren in diese Zellen fördern.

Es wurden folgende Fragestellungen definiert:

1. Kann der bereits dokumentierte Beitrag bestimmter Wirtszellfaktoren zum Ebolavirus-Eintritt in Zelllinien bestätigt werden?
2. Welche Relevanz haben bekannte Eintrittsfaktoren für den Eintritt von Ebolaviren in Makrophagen?
3. Welche Rezeptoren, die zur Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen beitragen, fördern auch den Ebolavirus-Eintritt in diese Zellen?

Da mit vermehrungsfähigen Ebolaviren nur in einem Sicherheitslabor der Stufe 4 gearbeitet werden darf, sollten für die Analyse des Ebolavirus-Eintritts Vektorsysteme eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um einmal infektiöse, vermehrungsunfähige Virus-Partikel, in deren Hülle das Glykoprotein von Ebolaviren eingebaut wird.

4 Material und Methoden

4.1 Materialübersicht

4.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Adhärenz	Einsatz
293T	Humane embryonale Nierenzellen	Ja	Transfektionen Expressionsversuche Bindungsassays
A549	Humane adenokarzinomatöse alveolare Basalepithelzellen	Ja	Expressionsversuche
BEAS-2B	Humane Bronchialepithelzellen	Ja	Expressionsversuche
C81-66	Humane T Zelleukämiezellen	Nein	RT-PCR Expressionsversuche
CHO	Chinesische Hamsteroarzellen	Ja	Expressionsversuche
CHO-hMR	humanen Mannoserezeptor exprimierende chinesische Hamsteroarzellen	Ja	Expressionsversuche, zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Maridonneau-Parini, Toulouse
Ea-Hy	Humane Hybridendothelzellen	Ja	Expressionsversuche
H1299	Humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzellen	Ja	Expressionsversuche
HeLa	Humane Zervixkarzinomepithelzellen	Ja	Expressionsversuche Inhibitionsexperimente
HepG2	Humane Leberkarzinomzellen	Ja	Expressionsversuche
HOS	Humane Osteosarkomzellen	Ja	Expressionsversuche
Huh7	Humane Leberkarzinomzellen	Ja	Expressionsversuche

			Inhibitionsexperimente	
L929	Murine Fibrosarkomzellen	Ja	Herstellung	von Mausemakrophagen
Raji	Humane B Zellen (Burkitt-Lymphom)	Nein	RT-PCR	Expressionsversuche
RPE	Humane Retinapigmentepithelzellen	Ja	Expressionsversuche	
THP1	Humane monozytäre Leukämiezellen	Nein	Inhibitionsexperimente	
U373	Humane Glioblastomzellen	Ja	Expressionsversuche	

4.1.2 Zellkulturmedium und Zusätze

Medium	Zusätzliche Inhaltsstoffe	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	4,5 g/l Glucose L-Glutamine Phenolrot	Gibco, später PAN
RPMI-1640	L-Glutamine	PAA, später PAN
OptiMEM	L-Glutamine Phenolrot	Gibco
X-Vivo 10	1% Fibrin-depletiertes Plasma +1% Penicillin/ Streptomycin	Lonza
MoAM (monocyte adhesion medium)	RPMI 1640 + 7,5% Fibrin-depletiertes Plasma + 1% Penicillin/ Streptomycin	
FKS (Fetales Kälberserum)		Biochrom
Humanes Plasma		Transfusionmedizin der Universitätsmedizin Göttingen
Penicillin/ Streptomycin 100x		Cytogen
G418 Geneticindisulfat 1 g	5 mg/ml	Carl Roth

4.1.3 Plasmide

Interne Nummer	Bezeichnung	Ergänzung
#2	HIV-1 (NL4-3 luc Env * Nef*)	(CONNOR et al. 1995)
#20	GFP	
#21	DC-SIGN	extrazellulärer C-terminaler AU1-Tag; (POHLMANN et al. 2001a)
#22	DC-SIGNR	extrazellulärer C-terminaler AU1-Tag; (POHLMANN et al. 2001b)
#32	VSV-G	(SIMMONS et al. 2003a, NALDINI et al. 1996)
#57	pcDNA3.1	Invitrogen
#58	pCAGGS	(NIWA et al. 1991)
#69	EBOV-GP	Zaire ebolavirus Glykoprotein (MARZI et al. 2006) Genbank U81161
#126	ASGPR1	extrazellulärer C-terminaler AU1-Tag; (LIN et al. 2003)
#141	EBOV-GP Δ muc	Zaire ebolavirus mit Deletion zwischen den AS 309-489 (MARZI et al. 2006)
#145	MARV-GP	Zur Verfügung gestellt von: S. Becker, Institut für Virologie, Marburg
#232	ACE-2	(HOFMANN et al. 2004)
#256	LSEctin	(GRAMBERG et al. 2005)
#321	Fc	pAB61 Vector zur Produktion von Kontroll-Fc
#351	SARS-S-Fc	(HOFMANN et al. 2005)
#517	EBOV-GP-Fc	(GRAMBERG et al. 2005)
#801	Mer	Zur Verfügung gestellt von: H.S. Earp, University of North Carolina, Chapel Hill
#817	Axl	Bezogen von ImaGenes Genbank NM021913

#818	Tyro3	Bezogen von ImaGenes Genbank: HSU18934
#1070	TIM-1	Genbank: HQ412639.1
#1205	NPC1-FLAG	Zur Verfügung gestellt von: K. Chandran, Albert Einstein College of Medicine, New York
#1214	TIM-3	Zur Verfügung gestellt von: W. Kühn, Universitätsklinikum Freiburg
#1219	HIV-gag-pol	Zur Verfügung gestellt von: T. v.Hahn, Medizinische Hochschule Hannover (CIESEK et al. 2011)
#1220	CSF Luc W2 (Luciferase)	Zur Verfügung gestellt von: T. v.Hahn, Medizinische Hochschule Hannover (CIESEK et al. 2011)
#1227	CLEC5A	Zur Verfügung gestellt von: C. O`Callaghan, The Queen`s College, Oxford
#1229	FR- α	Zur Verfügung gestellt von: G. Simmons, University of California, San Francisco
#1255	TIM-4	kloniert über RT-PCR aus PBMC--RNA
#1276	NPC1	kloniert über RT-PCR aus Huh7-RNA
#1354	SR-A1	kloniert über RT-PCR aus THP-1-RNA
#1355	SR-A2	kloniert über RT-PCR aus THP-1-RNA
#1360	Maus SR-A	Zur Verfügung gestellt von: Dr. Post, University of Arkansas, Little Rock, US
#1386	hMGL	Zur Verfügung gestellt von: T. Irimura, The University of Tokyo, Tokyo

4.1.4 siRNA

Alle siRNAs wurden von der Firma Santa Cruz bezogen. Folgende siRNAs wurden verwendet:

Axl	Control siRNA-A	Integrin α_V	Ox-LDL R-1
CD14	Control siRNA (Fluorescein Conjugate)-A	MerTK	SR-A
CD36	FR- α	NPC1	TIM-1

4.1.5 Antikörper

Antikörper	Gerichtet gegen	Ursprung	Firma	Verdünnung
ACE2	Mensch	Ziege IgG	R&D Systems	FACS: 1:500 Konzentration: 1 mg/ml
Alexa Fluor 647	Maus	Ziege IgG	Invitrogen	FACS: 1:400 Konzentration: 1 mg/ml
Axl	Mensch	Maus IgG1	R&D Systems	FACS: 1:200 Konzentration: 0,5 mg/ml
CD14-FITC	Mensch	Maus IgG _{2a}	BD Pharmingen	FACS: 1:5
CD206 (antiMR)	Mensch	Maus IgG ₁	AbD Serotec	FACS: 1:200 Konzentration 0,5 mg/ml
Cy5	Ziege	Kaninchen	Dianova	FACS: 1:500 Konzentration: 1,5 mg/ml
DC SIGN „526“	Mensch	Maus IgG _{2a}	AIDS Repository	FACS: 1:400 Konzentration 1 mg/ml
FITC	Mensch	Ziege IgG	Dianova	FACS: 1:200 Konzentration: 1 mg/ml
FLAG		Maus IgG ₁	Agilent Technologies	FACS: 1:6000 Western Blot: 1:1000 Konzentration: 3 mg/ml
FR- α	Mensch	Ziege IgG	R&D Systems	FACS: 1:500 Konzentration 1 mg/ml
HRP	Mensch	Ziege IgG	Dianova	Western Blot: 1:10.000 Konzentration: 0,8 mg/ml
HRP	Maus	Ziege IgG	Dianova	Western Blot: 1:10.000
Isotyp IgG1		Maus	R&D Systems	Konzentration: 0,5 mg/ml
Isotyp IgG2a		Maus	R&D Systems	Konzentration: 0,5 mg/ml

Isotyp IgG _{2a} -FITC		Maus	BD Pharmingen	FACS: 1:5
Mer	Mensch	Maus IgG ₁	R&D Systems	FACS: 1:40 Western Blot: 1:500 Konzentration: 0,5 mg/ml
NPC1	Mensch	Maus IgG _{2a}	Santa Cruz	FACS: 1:50 Western Blot: 1:100
SR-A1	Mensch	Maus IgG ₁	R&D Systems	Western Blot: 1:1000 FACS: 1:400 Konzentration 1 mg/ml
TIM-1	Mensch	Maus IgG _{2B}	R&D Systems	FACS: 1:400 Konzentration: 1 mg/ml
β-Actin		Maus IgG ₁	Sigma-Aldrich	Western Blot: 1:1000

4.1.6 Reagenzien und Puffer

Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	Invitrogen
Acrylamidlösung 30% Rotiphorese Gel A	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumperoxydisulphat (APS)	Roth
Ampicillin Sodium Salt	Roth
Biocoll Separating Solution	Biochrom
Bisacrylamid 2% Rotiphorese Gel B	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Roth
ddH ₂ O	Millipore-Anlage Infektionsbiologie DPZ
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
EDTA	Sigma

Ethidiumbromid	Roth
Fucoidan	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HEPES	Roth
Isopropanol	Roth
LB-Medium	Roth
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Luziferase Assay System	Promega
Marker DNA: Gene Ruler DNA Ladder Mix 10kb	Fermentas
Marker WB: Pageruler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Na ₂ HPO ₄	Roth
NaCl	Roth
NaOH	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumdeoxycholat	Merck
Natriumsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)	Sigma
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Infektionsbiologie DPZ
PFA 4%	Roth
PMA	Sigma
PMSF	Fluka
Saponin	Fluka
<i>tannic acid</i>	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich
TRIS	Roth
TRIS-hydrochlorid	Roth

Triton X 100		Sigma
Trypsin		Biochrom
Tween 20		Sigma
U18666A		Cayman Chemical
Wortmannin		Merck/Calbiochem
β -Mercaptoethanol		Sigma
Puffer und Gele		
Blotting Puffer		
10x Elektrophoresepuffer	100 ml	
Methanol	200 ml	
dH ₂ O	700 ml	
Elektrophoresepuffer		
TRIS	30,3 g	
Glycin	143 g	
ddH ₂ O	1 l	
FACS-Puffer		
10x PBS	100 ml	
FKS	50 ml	
1M EDTA	2 ml	nicht enthalten bei DC-SIGN FACS-Analyse
0,05% Natriumazid	10 ml	aus 5% Stammlösung
ddH ₂ O	Ad 1 l	
2x HBS Puffer		
NaCl ₂	16,4 g	
HEPES	11,9 g	
Na ₂ HPO ₄	0,2 g	
ddH ₂ O	Ad 1 l	
10M NaOH	Einstellen des pH-Werts zwischen 7,08 und 7,12	

Laufpuffer

10x Elektrophoresepuffer	50 ml
--------------------------	-------

10% SDS	5 ml
---------	------

ddH ₂ O	Ad 500 ml
--------------------	-----------

Lysepuffer

Triton X 100 0,5%	2,5 ml
-------------------	--------

1x PBS	Ad 500 ml
--------	-----------

RIPA-Puffer

0,1% Natriumsulfat	1 ml	aus 10% Stammlösung
--------------------	------	---------------------

(*Sodium dodecyl sulfate*)

1% Triton X 100	1 ml
-----------------	------

1% Natriumdeoxycholat	1 g
-----------------------	-----

50mM TRIS-hydrochlorid	1 ml	aus 1M Stammlösung
------------------------	------	--------------------

pH 7,3

150mM NaCl	3 ml	aus 5M Stammlösung
------------	------	--------------------

1mM PMSF	0,5 ml	aus 200mM Stammlösung
----------	--------	-----------------------

ddH ₂ O	Ad 100 ml
--------------------	-----------

SDS-Gele

10% Trenngel

5 ml	30% Acrylamid
------	---------------

1 ml	2% Bisacrylamid
------	-----------------

0,15 ml	10% SDS
---------	---------

2,8 ml	2M TRIS pH 8,8
--------	----------------

6,3 ml	dH ₂ O
--------	-------------------

kurz vor dem Gießen
hinzufügen:

56,2 µl	10% APS
---------	---------

11,25 µl	Tetramethylethyldiamin
----------	------------------------

unmittelbar nach dem Gießen:

	300 µl	für 45 Min. mit Isopropanol überschichten bis zum Gießen des Sammelgels
5% Sammelgel	0,85 ml	30% Acrylamid
	0,35 ml	2% Bisacrylamid
	0,62 ml	1M TRIS pH 6,8
	3,15 ml	dH ₂ O

kurz vor dem Gießen
hinzufügen:

	25 µl	10% APS
	10 µl	Tetramethylethyldiamin
		Isopropanol vom Trenngel abschütten, überlagern mit Sammelgel, Kamm einfügen, 15 Min. später bis zur Nutzung auf 4°C lagern

SDS Ladepuffer

1M TRIS pH 6,8	1,5 ml
80% Glycerin	6 ml
10xSDS	10 ml
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
1% Bromphenolblau	5 ml
1M EDTA	50 µl

Stripping Puffer

1M TRIS-hydrochlorid pH 6,8	31,25 ml
10% SDS	100 ml
H ₂ O	Ad 500 ml
100mM β-Mercaptoethanol	3,5 ml

4.1.7 Verbrauchsmaterial

Sterile Einmalartikel für Zellkulturarbeiten wurden von Greiner Bio One, Heinemann, Hartenstein, Nunc, Sarstedt und Sartorius bezogen. BD Falcon lieferte FACS-Röhrchen. Enzyme wurden von der Firma Fermentas verwendet. Kits wurden bezogen von Qiagen, Invitrogen, Macherey-Nagel und Thermo Scientific.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Alle adhärenenten Zellen wuchsen in 10 ml DMEM mit 5-10% FKS (fetales Kälberserum) und 1% Penicillin/ Streptomycin in T75 Zellkulturflaschen (Sarstedt). Die Aufrechterhaltung von THP-1, C81-66 und Raji Zellen erfolgte in RPMI-1640 Medium mit gleichen Zusätzen. CHO-hMR Zellen erhielten zusätzlich 5 mg/ml G418. Alle Zellen waren standardmäßig im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ untergebracht und wurden unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Zum Aufteilen konfluenten Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Das Ablösen erfolgte durch die Inkubation der Zellen mit 1 ml 10fach verdünntem Trypsin. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in neuem Medium aufgenommen und nach Bedarf aufgeteilt oder mithilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und ausgesät. THP-1 Zellen wurden sorgfältig resuspendiert, ein Teil der Zellen entfernt und neues Medium entsprechend hinzugefügt. Zum Einfrieren auf -80°C wurden gelöste Zellen für 5 Min. bei 500 g und Raumtemperatur in 15 ml Röhrchen (Greiner Bio One) zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme in FKS mit 10% DMSO und das Aufteilen und Einfrieren der Zellen. Zum Aussäen frisch aufgetauter Zellen wurden diese zunächst in Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert, bevor wie oben beschrieben eine Zentrifugation folgte. Der Überstand nach Zentrifugation wurde verworfen und die Zellen in neuem Medium aufgenommen, bevor sie in T25 Zellkulturflaschen ausgesät wurden.

Die Differenzierung von THP-1 Zellen in Makrophagen erfolgte durch Zusatz von Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 10 ng/ml) zum Medium für 48h, wodurch die THP-1 Zellen adhärenent wurden.

4.2.2 Isolation humaner primärer Makrophagen

Herstellung humanen Fibrin-depletierten Plasmas

Der Zusatz von humanem Fibrin-depletierten Plasma ist essentiell für die Differenzierung isolierter Monozyten. Zur Herstellung wurden Plasmaspenden steril auf 50ml Röhrchen aufgeteilt und im Wasserbad bei 56°C für 30 Min. erhitzt. Anschließend wurden die Röhrchen für 30 Min. unter laufendem Wasser abgekühlt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30 Min. bei 4800 g. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Humane primäre Makrophagen

Zur Herstellung primärer Makrophagen wurden Schläuche aus der Thrombozytengewinnung (Thrombozytapherese) verwendet, bei der Leukozyten als Nebenprodukt isoliert werden. Die Thrombozytaphereseschläuche wurden von der Transfusionsmedizin der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Diese Schläuche wurden zunächst unter sterilen Bedingungen intensiv mit kaltem PBS gespült und der Durchlauf in T75 Flaschen aufgefangen, die Schläuche wurden anschließend entsorgt. Leucosep™ 50 ml Röhrchen (Greiner) wurden mit 15 ml Biocoll befüllt und gemäß Hersteller 30 Sek. bei 1000 g zentrifugiert. Danach wurde der Durchlauf aus den Thrombozytaphereseschläuchen auf die Leucosep™-Röhrchen geschichtet und diese bei 1000 g 10 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und bei 880 g 8 Min. wieder mit Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, das Pellet gelöst und erneut mit PBS aufgefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 8 Min. bei 500 g. Der Vorgang nach der Zentrifugation wurde wiederholt und die Pellets in zwei Röhrchen pro Donor vereint. Die letzte Zentrifugation dauerte wiederum 8 Min. bei 320 g. Nach Verwerfen des Überstands und erneutem Lösen des Pellets erfolgte die Aufnahme der Zellen (PBMC= periphere Blutmonozyten) in 25 ml MoAM pro Röhrchen und die Überführung in 14,5 cm Zellkulturplatten (Greiner Bio One). Diese verblieben für 45-90 Min. im Inkubator.

Anschließend wurden die Zellen 5-7x vorsichtig mit ~20 ml warmem PBS gewaschen, mit neuem MoAM überschichtet und über Nacht inkubiert.

24h später wurde der Überstand abgenommen und nach dem Waschen der Platten mit je 10 ml PBS gepoolt. Dieser wurde für 5 Min. bei 320 g zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Parallel wurden die gewaschenen Platten mit je 5 ml Accutase für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Nach 15 Min. erfolgte ein erneuter Waschschrift, in dem die Accutase mit 10 ml PBS verdünnt wurde. Der Accutase-PBS-Zellmix wurde zu dem Pellet aus der Zentrifugation gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Die Platten wurden so lange gewaschen, bis keine adhärenen Zellen mehr sichtbar waren, gegebenenfalls unter Einsatz von Zellschabern (Hartenstein). Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet gelöst und je nach Größe in 10-20 ml X-Vivo + 1% Fibrin-depletiertes Plasma + Pen/Strep aufgenommen. Die Monozyten wurden anschließend gezählt und im 96well à 75.000 Zellen/ well und im 12well à $4,5 \times 10^5$ Zellen/ ml ausgesät. Alle 3-4 Tage erfolgte ein kompletter Mediumwechsel, nach 7 Tagen waren die Monozyten ausdifferenziert.

4.2.3 Isolation von Mausmakrophagen

Ursprung der Mäuse

Bei den Mäusen, die zur Präparation von Makrophagen genutzt wurden, handelt es sich um Tiere des Stamms C57BL/6. Die Wildtypmäuse (C57BL/6J) stammten aus der Zucht der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen. Die verwendeten *Knockout*-Mäuse hatten Deletionen im Bereich des Gens MSR1 = SR-A (C57BL/6J; „SR-A KO“) oder im Bereich des Gens Hrg (C57BL/6N; Wildtyp-*knockout* („Wt KO“)) und wurden freundlicherweise von der Gruppe um Prof. Jahnen-Dechent in Aachen zur Verfügung gestellt.

Die Nachzucht der Wildtypmäuse basiert auf Tieren der Firma Charles River. Zum Zeitpunkt der Abgabe waren sie im Alter zwischen 6-9 Monaten, es handelte sich um 4 weibliche und 2 männliche Tiere. Es werden 8 Tiere pro in Typ III Käfigen der Firma Ehret bei 50% Luftfeuchtigkeit 20°C gehalten mit einem Tag-Nacht-Zyklus von je 12 Stunden. Futter (RM, Firma Sniff) und Wasser stehen ad libitum zur Verfügung. Der Gesundheitsstatus wird halbjährlich überprüft.

Bei den *Knockout*mäusen aus Aachen handelt es sich um Nachzuchten aus dem Zentrallaboratorium für Versuchstierkunde der RWTH Aachen. Zum Zeitpunkt der Abgabe waren die Tiere zwischen 15-19 Wochen alt. Bei den „Wt KO“-Mäusen handelte es sich um 4 Männchen, bei den „SR-A KO“-Tiere um drei Weibchen und ein Männchen. Der Gesundheitsstatus der Tiere wird vierteljährlich mithilfe von Sentineltieren geprüft, die getesteten Tiere waren frei von Pathogenen gemäß der FELASA Empfehlungen.

Die Mäuse wurden fachgerecht lebend versendet und vor Ort zur Probengewinnung mithilfe von Isofluran euthanasiert. Eine Genehmigungspflicht für den Eingriff bestand nach deutschem Tierschutzgesetz in der gültigen Fassung nicht.

Präparation von Makrophagen aus Knochenmark

Femora und Tibiae der euthanasierten Mäuse wurden isoliert, indem nach Eröffnung des Abdomens die Hinterbeine im Bereich des Femurkopfes aus der Hüftpfanne gelöst wurden. Unter sterilen Bedingungen wurden die Epiphysen entfernt und die Knochen mit je 20 ml RPMI-1640 Medium unter Zuhilfenahme von Kanülen der Größe 27 gauge gespült. Knochenmarkszellen eines Beins wurden vereint und bei 320 g 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet aufgenommen in 25 ml RPMI, das mit 10% FKS, 20% L929 Überstand und 1% Penicillin/ Streptomycin ergänzt war. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit 15 cm Durchmesser aufgenommen. 3 Tage nach dem Aussäen wurden 15 ml Kulturmedium ergänzt, nach 6 Tagen wurde das Medium komplett ersetzt. Da die Zellen nun ausdifferenziert waren, wurde Medium ohne L929 Überstand genutzt. Nach 9 Tagen folgte das Aussäen der Zellen in 96well-Platten à 75.000 Zellen/ well.

Um L929 Überstand zur Differenzierung zu gewinnen, wurden diese in Zellkulturmedium mit 10% FKS bis zur 80-90% Konfluenz gezogen. Die Zellen wurden in T175 Flaschen umgesetzt. Es folgte ein Mediumwechsel nach 48h mit 5% FKS. Erneute 48h und 96h später wurde der Überstand geerntet und bei 2000 g 5 Min. zentrifugiert. Anschließend folgte eine Filtration durch 0,22 µm Filter und der Überstand wurde bis zur Nutzung auf -20 °C eingefroren.

Präparation von Makrophagen aus Lunge

Die Trachea der euthanasierten Mäuse wurde mittels eines Hautschnitts freigelegt, die Mäuse wurden in Rückenlage fixiert. Umliegendes Gewebe wurde vorsichtig zur Seite präpariert. 3-4 Trachealspangen distal des Kehlkopfs wurde die Trachea ventral eingeschnitten und ein Venenverweilkatheter der Größe 20 gauge ohne Mandrin nach distal gerichtet bis zur Trachealaufzweigung vorgeschoben. Unter manueller Fixierung des Katheters wurden 1 ml eiskaltes PBS in die Lunge durch den Katheter injiziert und mittels der aufgesetzten Spritze wieder herausgezogen. Die aufgezogene PBS-Zell-Mischung wurde in ein Röhrchen auf Eis überführt und der Vorgang so oft wiederholt, bis nur noch klare Flüssigkeit aus der Lunge aufgezogen werden konnte. Die Zellsuspensionen von jeweils 2 Mäusen wurden gepoolt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 Min. bei 320 g. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 2 ml RPMI + 10% FKS + 1% Penicillin/ Streptomycin + 20% L929 Überstand aufgenommen. Nach dem Zählen wurden 75.000 Zellen pro 96well ausgesät und 12h später mit den entsprechenden EBOV-GP-tragenden Vektoren transduziert.

4.2.4 Herstellung Plasmide

Zur Herstellung von Plasmiden für TIM-1, TIM-4 und die SR-A-Isoformen über RT-PCR wurde zunächst RNA aus Huh7 (TIM-1), PBMC (TIM-4) und THP-1 (SR-A Isoformen) mithilfe des RNA-Kits RNeasy Plus Mini (Qiagen) gemäß Hersteller isoliert. Mithilfe des SuperScript™ III One-Step RT-PCR Systems mit Platinum® Taq High Fidelity und entsprechenden Primern wurde die RNA revers in cDNA transkribiert und vervielfältigt. Anschließend wurden Vektoren und cDNA mit entsprechenden Enzymen behandelt, über Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarosegel mit 0,002% Ethidiumbromid) aufgetrennt und der Vektor pCAGGS bzw. die Rezeptor-kodierende Sequenz mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kits aufgereinigt. Die Ligation von pCAGGS und der gewünschten Sequenz erfolgte mittels der T4 DNA Ligase (Thermo Scientific). Ein Escherichia coli-Laborstamm (DH10B) wurde mit der Ligation transformiert. Nach der Plasmid-DNA-Isolation (Mini QIAGEN Plasmid Mini Kit) und einem Testverdau wurde die DNA-Sequenz des

Plasmid-Inserts positiver Klone durch automatische Sequenzierung verifiziert. Positive Klone wurden über Nacht bei 37°C schüttelnd angezüchtet. Die Plasmid-DNA wurde mithilfe des Maxi QIAGEN Plasmid Kits gemäß Hersteller isoliert und der DNA-Gehalt am Nanodrop gemessen. Anschließend erfolgten ein erneuter Testverdau mit Plasmid-spezifischen Enzymen und die Auswertung der Spaltung mittels Agarose-Gelelektrophorese.

4.2.5 Transfektionen

CaPO₄-Transfektionen wurden mit 293T Zellen zur Herstellung rezeptorexprimierender Zellen und EBOV-GP-tragender Vektoren durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Dichte von $1,6 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Am folgenden Tag wurden standardmäßig 1-6 µg DNA im 6well-Format und 12 µg Gesamt-DNA in T25-Flaschen transfiziert. Die DNA wurde in autoklaviertem destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst und Calciumchlorid tropfend hinzugefügt. Anschließend wurde 2x HBS-Puffer ergänzt und der gesamte Ansatz 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor er auf die ausgesäten Zellen getropft wurde. 8h später erfolgte ein Mediumwechsel.

Herstellung von GP-tragenden Vektoren

Die Herstellung lentiviraler GP-tragender Vektoren basiert auf einem System mit 3 Komponenten, das im S2-Bereich gehandhabt werden kann und einem System aus 2 Komponenten, deren GP-tragende Vektoren unter S3-Bedingungen produziert werden. Beide Systeme basieren auf HIV-1. Das 3-Komponentensystem besteht aus einem Plasmid, das für HIV-gag-pol kodiert, einem Plasmid, das für die Firefly Luziferase kodiert und einem Plasmid des entsprechenden viralen Oberflächenproteins (CIESEK et al. 2011). Das 2-Komponentensystem besteht aus einem Plasmid, das für HIV-1 (NL4-3) mit zwei Stopcodons und einer Luziferase kodiert sowie einem Plasmid, das für ein entsprechendes virales Oberflächenprotein kodiert (CONNOR et al. 1995). Zur Herstellung der GP-tragenden Vektoren wurden die jeweiligen Plasmide der verschiedenen Komponentensysteme und zusätzlich Plasmide für VSV-G, EBOV-GP, EBOV-GPΔmuc oder pcDNA3.1 (Kontrolle, Plasmid ohne Oberflächenprotein) ad 225 µl ddH₂O aufgenommen und mithilfe der CaPO₄-Transfektion (25 µl CaCl₂, 250 µl HBS-Puffer) auf die Zellen in T25 Flaschen

gebracht. 8h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. 48h später wurden die GP-tragenden Vektoren je nach System unter BSL2- oder BSL3-Bedingungen geerntet. Zum Ernten wurden die Überstände eines GP-tragenden Vektors gepoolt und durch 0,45 µm Filter steril filtriert, bevor sie auf -80°C eingefroren wurden.

Transduktion mit GP-tragenden Vektoren

Vor dem Einsatz im Experiment wurden die GP-tragenden Vektoren auf Infektiosität in 293T Zellen im 96well-Format getestet. Dieser Test wird ermöglicht, indem die GP-tragenden Vektoren ein Gen für Luziferase exprimieren, die bei erfolgreicher Transduktion von den Zellen exprimiert wird. Durch den Umsatz eines speziellen Substrats durch die Luziferase kann die Transduktion mithilfe eines Luminometers detektiert werden. Zum Test der GP-tragenden Vektoren wurden die Zellen mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/ well in je 50 µl ausgesät. Am folgenden Tag wurden je 50 µl Überstand auf die Zellen gegeben. Nach 8h erfolgte ein Mediumwechsel. 72h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert, in weiße 96well-Platten überführt und die Luziferaseexpression der Zellen mithilfe des Luminometers nach Injektion einer Luziferinlösung (Promega) gemessen. Für Transduktion mit GP-tragenden Vektoren in Zelllinien wurden in der Regel Vektoren des 3-Komponenten-Systems genutzt. Auf Makrophagen und in Versuchen, die CHO-Zellen beinhalteten, wurden mit Vektoren des 2-Komponentensystems gearbeitet. Erstere wurden zusätzlich für 2h bei 880g bei Raumtemperatur zentrifugiert („spininfiziert“). VSV-G-exprimierende Vektoren und Vektoren, die kein Oberflächenprotein tragen (pcDNA3.1 transfizierte Zellen) dienten als unabhängige Kontrollen. Die Daten wurden im Anschluss mithilfe von Microsoft Excel 2010 ausgewertet.

4.2.6 Expressionsversuche

Transduktion Rezeptor-exprimierender Zellen

Um die Fähigkeit verschiedener Moleküle auf Verstärkung der GP-vermittelten Transduktion zu testen, wurden diese zunächst im 6well-Format in 293T-Zellen transfiziert. Die Expression von zusätzlich transfiziertem GFP (grün fluoreszierendes Protein) diente als Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen abgespült, 1:3 bis 1:5 verdünnt und à 50 µl im 96well

ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte die Transduktion wie oben beschrieben. Als Positivkontrollen für die erfolgreiche Verstärkung des EBOV-GP vermittelten Eintritts wirkte DC-SIGN.

FACS Färbung zur Expressionsanalyse

Um zu testen, ob die transfizierten Zellen und nicht-transfizierte Zelllinien positiv für entsprechende Rezeptoren waren, wurden die Zellen im FACS analysiert. Dazu wurden Zellen von ihrem Untergrund mit FACS-Puffer ab gespült oder abgeschabt. $1-4 \times 10^5$ Zellen wurden in FACS Röhren überführt und für 5 Min. bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt, je 1ml FACS-Puffer hinzugefügt, die Röhren gevortext und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde gegebenenfalls wiederholt. Nach dem letzten Abkippen folgte die Zugabe von je 100 µl in FACS-Puffer gelöstem Antikörper zu den Zellen, der spezifisch gegen den Rezeptor gerichtet war oder die Zugabe der entsprechenden Isotypenkontrolle. Die FACS-Röhren mit Antikörper-Zell-Mix wurden für 30 Min. dunkel auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von je 1 ml FACS-Puffer, Vortexen und eine erneute Zentrifugation für 5 Min. bei 4°C 500 g. Nach Abkippen des Überstands wurde der Vorgang noch ein- bis zweimal wiederholt. Nach erneutem Abkippen erfolgte die Zugabe von je 100 µl des sekundären fluoreszierenden Antikörpers, der ebenfalls in FACS-Puffer gelöst und gegen den ersten Antikörper gerichtet war. Der Ansatz wurde 30 Min. dunkel auf Eis inkubiert. Anschließend wurde verfahren wie nach der ersten Antikörperinkubation. Nach dem letzten Abkippen des Überstands wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer und 200 µl PFA 4% fixiert und bei 4°C bis zur Messung mit dem Zytometer LSR II (mindestens 20 Min.) aufbewahrt. Um eine Antikörperbindung an DC-SIGN nachzuweisen, musste der FACS-Puffer ohne EDTA vorbereitet werden. Dies war notwendig, da Ca^{2+} -Ionen für die Antikörperbindung erforderlich sind, die ansonsten durch die Chelatwirkung des EDTAs maskiert werden. Die Datengenerierung am BD LSR II erfolgte mithilfe der BD FACS Diva Software, die Analyse mit dem Programm FCS Express 4 Flow Research Edition.

Zur Analyse von intrazellulärem NPC1 wurden die Zellen nach Überführung in FACS Röhren mit je 500 µl eiskaltem 80% Ethanol für 10 Min. bei Raumtemperatur

dunkel inkubiert. Nach Zugabe von je 2 ml PBS und vorsichtigem Vortexen erfolgte eine Zentrifugation für 5 Min. bei 4°C und 320 g. Anschließend wurden die Zellen mit in 0,1% Saponin gelösten Antikörpern wie oben beschrieben inkubiert.

RT-PCR Analyse

Zur Analyse der Expression verschiedener Rezeptorkandidaten auf Zelllinien und Makrophagen wurde zunächst RNA aus HeLa, Huh7, 293T, C81-66, Raji-Zellen und einem Pool von Makrophagen verschiedener Donoren mithilfe des RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen) isoliert. Zur Analyse der NPC1-Expression wurde die RNA aus Huh7, 293T, C81-66 und Raji-Zellen genutzt. 100 ng der jeweiligen RNA wurden mit dem SuperScript™ III One-Step RT-PCR Systems mit Platinum® Taq High Fidelity Kit in cDNA nach Herstellerangaben transkribiert. Die cDNA wurde mit den Primern p5-NPC1 5'-GAGTTACAATACTACGTCGGACAG-3' und p3-NPC1 5'-CCGTTTTCTGTAGCACCACACTGC-3' amplifiziert. Als Test für die Unversehrtheit der RNA wurde GAPDH eingesetzt, ein sogenanntes „housekeeping gene“, das ubiquitär exprimiert wird.

Um TIM-1-, Axl- und NPC1-Transkripte nachzuweisen, wurde die isolierte RNA von HeLa, Huh7, C81-66 und humanen Makrophagen mit dem ABI 7500 FAST real-time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad) getestet. Dieser Nachweis wurde freundlicherweise von Dr. Oliver Dittrich-Breiholz und Heike Schneider in der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Jede PCR-Reaktion enthielt 0,5 µg zelluläre RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Die Amplifikation erfolgte mithilfe des TaqMan gene expression assays (Life Technologies) entsprechend der Herstellerangaben. Folgende Assays wurden genutzt: Hs03054852_g1 (TIM-1), Hs01064444_m1 (Axl) and Hs00264835_m1 (NPC1) sowie Hs99999908_m1 (β-glucuronidase [GUSB]). Der durchschnittliche Ct-Wert („cycle threshold“-Wert) jedes Assays wurde aus drei unabhängigen Messungen durch die „7500 FAST System Software, Version 1.3.0“ im Auto CT Modus ermittelt. Als Referenz dienten die Ct-Werte des *housekeeping genes* GUSB. Zur Normalisierung wurden die durchschnittlichen Ct-Werte von TIM-1, Axl und NPC1 vom GUSB Ct-Wert abgezogen.

4.2.7 Bindungsassay

Herstellung von löslichem Protein

293T Zellen wurden in T25-Flaschen jeweils mit den Plasmiden für Fc, SARS-S-Fc und EBOV-GP-Fc transfiziert. 8h nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium mit OptiMEM inklusive 1% Penicillin/ Streptomycin ersetzt. 48h nach der Transfektion wurden die Überstände gleicher Transfektion gepoolt und für 5 Min. bei 500 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in Vivaspin 20 (30 kDa)-Röhrchen überführt und für mindestens 30 Min. bei 4000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, der Überstand mit löslichem Protein (rund 200 µl) aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Um äquivalente Mengen des löslichen Proteins im Bindungsassay einsetzen zu können, wurde das lösliche Protein im Western Blot mithilfe des antihumanen HRP-Antikörpers analysiert.

FACS-Bindung

Mit Rezeptoren transfizierte 293T Zellen inklusive der Kontrollen pcDNA3.1, DC-SIGN und ACE2 wurden am Tag nach der Transfektion entsprechend der FACS-Färbung verfahren. Infolge der Verwendung von DC-SIGN wurden Bindungsassays mit FACS-Puffer ohne EDTA durchgeführt. In jedem Bindungsassay wurde parallel die Expressionsstärke der jeweiligen Rezeptoren überprüft. Ergänzend wurden die Zellen statt der Inkubation mit dem ersten Antikörper mit löslichem Protein für 30 Min. auf Eis inkubiert. Diese Fc-gekoppelten Proteine wurden wie Antikörper in FACS-Puffer verdünnt, sodass pro FACS-Röhrchen 100 µl eingesetzt wurden. In der Regel betrug die Verdünnung für Fc alleine 1:10, für SARS-S-Fc 1:5 und für EBOV-GP-Fc 1:50 bis 1:100. Die folgenden Schritte entsprachen erneut der FACS-Färbung, als sekundärer Antikörper wurde ein gegen Fc gerichteter antihumaner FITC-Antikörper verwendet und bis zur Messung verfahren wie oben beschrieben.

4.2.8 Inhibitionsexperimente

siRNA knockdown

siRNA *knockdown* wurde auf HeLa, Huh7 und primären Makrophagen durchgeführt. HeLa und Huh7 wurden so ausgesät, dass sie am folgenden Tag zu 80% konfluent

waren. Primäre Makrophagen wurde zwischen Tag 7 und Tag 14 nach dem Aussäen genutzt. Für folgende FACS-Färbungen wurden die Zellen im 12well-Format und für Infektionsexperimente im 96well-Format ausgesät. Jeder *knockdown* wurde pro GP-tragenden Vektor in Triplikaten durchgeführt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf einen *knockdown* in einem 96well. Das Kulturmedium der Makrophagen wurde vor der siRNA-Transfektion ausgetauscht gegen 100 µl Kulturmedium (X-Vivo 10) ohne Zusätze, HeLa und Huh7 wurden in Anwesenheit von 50 µl OptiMEM ohne Zusätze transfiziert. Für einen einfachen Ansatz wurden 5 pmol siRNA (0,5 µl) in 25 µl X-Vivo 10 bzw. OptiMEM gelöst. Parallel dazu wurden 0,25 µl Lipofectamin 2000 auf gleiche Weise gelöst und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Ansätze wurden vereint und für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und als Gesamtansatz auf ein 96well gegeben. Die Abnahme der siRNA erfolgte lediglich bei den Zelllinien nach 4-6h.

Vor der Transduktion wurde 24h nach siRNA *knockdown* der Überstand auf 50 µl/ 96well reduziert und die Zellen anschließend wie beschrieben transduziert. 8h nach der Infektion erfolgten die Abnahme des Überstands und der Ersatz mit Zellkulturmedium inklusive aller Zusätze (Huh7/ HeLa: je 100 µl DMEM, Makrophagen: je 150 µl X-Vivo 10). 72h nach der Infektion wurden die Zellen mit einem Lysispuffer aufgeschlossen (Makrophagen mindestens 30 Min.) und die Infektion mit Hilfe des Luminometers ausgewertet.

Die Analyse des *knockdowns* mittels FACS und Western Blot wurde insbesondere in Bezug auf die Makrophagen strikt auf Eis durchgeführt. >24h nach dem *knockdown* wurden die Zellen abgspült/ abgeschabt für die folgende FACS-Färbung.

Für die Western Blot Analyse im 12well wurden Makrophagen auf Eis gestellt und mit 1ml eiskaltem PBS/ well gewaschen. Anschließend erfolgte eine Lyse auf Eis mit 50-70 µl eiskaltem RIPA-Puffer für 30 Min.. Die lysierten Zellen wurden in kalte Eppendorf*tubes* überführt und bei 4°C für weitere 30 Min. geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei für 30 Min. bei 17900 g auf 4°C. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen, mit 50 µl 2xSDS Ladepuffer ergänzt und die Proteine bei 42°C für 1 h Stunde denaturiert (nicht endogene Protein können auch

bei 95°C für 7 Min. denaturiert werden). Anschließend werden die Proteine direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei -20°C eingefroren.

Inhibitoren

Vor Einsatz der Inhibitoren wurden diese in DMSO (U18666A), ddH₂O (Fucoidan, Mannan, *tannic acid*), oder Methanol (Wortmannin) gelöst. Die Inhibitorversuche fanden alle auf primären Makrophagen 7-14d nach dem Aussäen im 96well statt. Sie wurden entsprechend der gewünschten Molarität in der doppelten Konzentration in X-Vivo 10 ohne Zusätze angesetzt. Unmittelbar vor der Zugabe zu den Zellen wurde das Zellkulturmedium der Makrophagen abgenommen und je 50 µl Inhibitoransatz hinzugegeben. Die Inhibitoren U18666A (30 Min.), Fucoidan (1h), Mannan (30 Min.), Tannic Acid (1h) und Wortmannin (1h) wurden auf den Zellen bei 37°C inkubiert, bevor sie mit je 50 µl GP-tragenden Vektoren transduziert wurden. Anschließend wurden die Makrophagen behandelt wie beim siRNA *knockdown* im Kapitel „Inhibitionsexperimente“ beschrieben.

4.2.9 Western Blot Analysen

Zunächst wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurde ein 10% SDS-Gel in eine Spannvorrichtung eingebaut und in die dafür vorgesehene Kammer gestellt. Diese wurde mit Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Kammern des SDS-Gels mit entsprechenden Mengen aufbereiteten Proteins (in 2xSDS-Ladepuffer, zwischen 15-30 µl je nach Kammergröße) und 5-7 µl Marker beladen. Anschließend wurde eine Spannung von 80 V an die Kammer angelegt, sodass sich die Proben im Sammelgel konzentrierten. Anschließend folgte eine Erhöhung der Spannung auf 150 V und es wurde gewartet, bis die Lauffront am unteren Ende des Gels in den Laufpuffer übergang. Anschließend erfolgte das eigentliche Blotting. Hierbei wurden die aufgetrennten Proteine des SDS-Gels auf eine Whatmanmembran (Hartenstein) übertragen. Dies geschah mittels Elektrophorese in Blottingpuffer bei einer angelegten Stromstärke von 350 mA für 1h. Anschließend wurde die Membran in 5% Milch (in PBS gelöstes Milchpulver) geblockt. Darauf folgte die einstündige Inkubation mit dem primären gegen das gewünschte Protein gerichteten Antikörper, dessen Verdünnung in 5%

Milch angesetzt wurde. Anschließend wurde die Membran in PBS (gegebenenfalls ergänzt mit 0,1% Tween 20) für 15-30 Min. gewaschen. Daraufhin wurde der sekundäre, HRP (Meerrettichperoxidase)-gekoppelte Antikörper in gleicher Weise inkubiert und anschließend gewaschen. Bei erfolgreicher Antikörperbindung erfolgte die Umsetzung eines Substrats (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) durch die HRP, sodass ein Signal im Western Blot Imager (Chemostar Imager von Intas) detektiert werden konnte. Zur Analyse der β -Actin Expression als Ladekontrolle wurde die Membran anschließend in Stripping Puffer gelegt. Sie wurde im Puffer für 30 Min. bei 50°C inkubiert bevor sie dreimal für 10 Min. mit PBS-Tween (0,1%) gewaschen wurde. Anschließend folgte erneutes Blocken mit 5% Milch und die Antikörperinkubation und Entwicklung wie oben beschrieben. Zur Quantifizierung der Signalstärken wurden die fertigen Bilder mithilfe des Programms ImageJ analysiert.

4.2.10 Infektion von Makrophagen mit replikationsfähigem Ebolavirus

Für die Infektion mit replikationsfähigem Virus wurden primäre Makrophagen in gekammerten Objektträgern (μ -Slide 8 well, ibidi) ($2,25 \times 10^5$ Zellen pro well) ausgesät. Insgesamt wurden 4 Donoren getestet. 11 Tage nach dem Aussäen wurde der dreifache siRNA-Ansatz eines 96wells transfiziert, TIM-1 siRNA diente als Kontrolle. Die Transfektion aller Ansätze erfolgte in Duplikaten. 24h später wurden die Infektionen mit replikationsfähigem Ebolavirus unter S4-Bedingungen von Dr. Nadine Biedenkopf am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Es handelte sich um auf Verozellen angezüchtetem Zaire ebolavirus, Stamm Mayinga. Für die Infektion von primären Makrophagen wurde Zaire ebolavirus mit einer MOI von 10 eingesetzt (siehe auch (MARTINEZ et al. 2013)). Zur Infektion von siRNA-behandelten Zellen wurde das Medium entfernt und 150 μ l Virusverdünnung (in X-Vivo 10) pro well für 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und die wells mit je 300 μ l X-Vivo 10 überschichtet. 16h nach der Infektion wurde der Überstand entfernt und die wells mit je 200 μ l PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nach den vorgeschriebenen Richtlinien mit 4% PFA/DMEM inaktiviert und aus dem S4-Bereich geschleust. Es folgte eine erneute Inaktivierung für mindestens 16h bei 4°C. Zur

Analyse der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300µl 100mM Glycin/PBS (Blocking Buffer) für 10 Min. bei Raumtemperatur geblockt. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte die Permeabilisierung der Zellen mit je 300µl 0,1% Triton X 100/ PBS für 7 Min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurde nochmals mit PBS gewaschen und je 300 µl Blocking Buffer für mindestens 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurden die Slides mit dem primären, gegen NP gerichteten Antikörper (1:750 verdünnt) und einem sekundären Antikörper (anti chicken (goat) DyLight488 (Abcam), 1:500 verdünnt) inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mit 1:10.000 verdünntem DAPI. Bis zur Analyse wurden die Slides bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte mit einem automatischen Mikroskop bei 20x Vergrößerung (Leica DMI6000B). Pro Well wurden 100 Bilder aufgenommen, von dem in jedem zehnten Bild die DAPI-gefärbten Zellkerne und NP-positiven Zellen manuell ausgezählt wurden. Zur anschließenden Auswertung wurden die Mittelwerte aus den Duplikaten gebildet und ins Verhältnis zur TIM-1-Kontrolle gesetzt.

4.2.11 Computerprogramme

Zur Datengenerierung und Auswertung wurden verschiedene Computerprogramme genutzt. Zur Auswertung der Western Blot Membranen wurden Bilder mithilfe des Chemostar Imagers von Intas generiert und mit dem Programm ImageJ ausgewertet. FACS-Proben wurden am BD LSR II mit dem Programm BD FACS Diva Software gemessen und mit dem Programm FCS Express 4 Flow Research Edition analysiert. Die Daten aus Transduktionsexperimenten wurden mithilfe des Hidex Plate Chameleon-Luminometers mit der MikroWin-Software generiert und mit Microsoft Excel 2010 bearbeitet. Sequenzanalysen wurden mittels VectorNTI (Invitrogen) durchgeführt.

5 Manuskript

Analysis of Ebola virus entry into macrophages

Franziska Dahlmann,^a Nadine Biedenkopf,^b Anne Babler,^c Wilhem Jahnen-Dechent,^c Christina Karsten,^a Kerstin Gnirß,^a Heike Schneider,^d Stephanie Bertram,^a Georg Herrler,^f

Stephan Becker,^b Stefan Pöhlmann,^{a,*} Heike Hofmann,^a

Infection Biology Unit, German Primate Center, Göttingen, Germany^a; Institute of Virology, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany^b; Helmholtz-Institute for Biomedical Engineering, RWTH Aachen University, Aachen, Germany^c; Institute for Physiological Chemistry, Hannover Medical School, Hannover, Germany^d; Institute of Virology, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany^f

* Corresponding author. Please direct correspondence to: Infection Biology Unit, German Primate Center, Kellnerweg 4, 37077 Göttingen, Germany. Phone: +49 551 3851 150, Fax: +49 551 3851 184, E-mail: s.poehlmann@dpz.eu

ABSTRACT

Ebolaviruses are the causative agents of a severe hemorrhagic fever and constitute a public health threat, particularly in sub-Saharan Africa. The identification of host cell factors required for spread of ebolaviruses will provide insights into viral pathogenesis and might define targets for antiviral intervention. Lectins, TAM receptor tyrosine kinases (Tyro3, Axl, Mer), TIM proteins, integrins and NPC1 were reported to promote entry of ebolaviruses into certain cellular systems. However, the factors used by ebolaviruses to invade macrophages, the major viral target cells, are largely unknown. Here, we show that mannose-specific lectins, TIM-1 and Axl augment entry into certain cell lines but do not contribute to Zaire ebolavirus glycoprotein (EBOV-GP)-driven transduction of macrophages. In contrast, expression of Mer,

integrin α V and NPC1 was required for efficient GP-mediated transduction and Zaire ebolavirus infection of macrophages. Finally, evidence for a role of scavenger receptor A in macrophage infection was obtained. In sum, our results define cellular factors hijacked by EBOV for entry into macrophages and, considering that Mer and integrin α V promote phagocytosis of apoptotic cells, support the concept that EBOV relies on apoptotic mimicry to invade target cells.

IMPORTANCE

Ebolaviruses are among the most virulent infectious agents known and approved vaccines or therapeutics are not available. The establishment of effective antiviral strategies and the understanding of viral pathogenesis require the elucidation of virus-host cell interactions essential for viral amplification in target cells. Macrophages are central target cells of ebolaviruses and play an important role in viral pathogenesis. However, the cellular factors required for infectious entry of ebolaviruses into macrophages are largely unknown. The present study shows that integrin α V and Mer, which promote phagocytosis of apoptotic cells, are required for macrophage invasion of Zaire ebolavirus, a finding that supports the idea that ebolaviruses mimic apoptotic cells to enter target cells. In addition, hints towards a role of scavenger receptor A in macrophage entry were obtained, suggesting that ebolaviruses can also usurp factors involved in pathogen recognition to enter macrophages. Finally, the demonstration that NPC1 is required for invasion of macrophages and all other cell systems tested, help to define this protein as a target for intervention.

INTRODUCTION

Viruses of the genus ebolavirus within the family *filoviridae* can cause a severe hemorrhagic fever in humans and non-human primates (1). Ebola hemorrhagic fever (EHF) is endemic in sub-Saharan Africa and might result from zoonotic transmission of ebolaviruses from bats, a natural reservoir, to humans (2, 3). Evidence for infection

of bats (4), swine and humans (5) with an Asian ebolavirus in the Philippines (6) and the import of ebolavirus infections into Europe and the US via infected travellers or infected non-human primates highlight that EHF constitutes a global health threat (1, 7-9). However, at present no approved vaccines or therapeutics are available to combat EHF. Host cell factors exploited by ebolaviruses for viral amplification constitute potential targets for antiviral intervention and blockade of factors required for the first step in viral replication, entry into target cells, might be particularly attractive.

The glycoprotein (GP) of ebolaviruses is necessary and sufficient for viral entry into host cells (10). GP is synthesized as an inactive precursor, GP0, in the constitutive secretory pathway of infected cells and, although functionally dispensable (11, 12), is cleaved by furin (13) into the surface unit GP1 and the transmembrane unit GP2, which remain covalently associated (14). The GP1 subunit contains an N-terminal receptor binding domain (RBD) (15) and interacts with host cell factors while the GP2 drives fusion of the viral membrane with the membrane of host cell endosomes (10). Entry of ebolaviruses into target cells is thought to commence upon viral binding to incompletely defined factors expressed at the host cell surface, followed by uptake of virions and processing of GP by endosomal cysteine proteases, in particular cathepsin B (16). Processed GP1 then interacts via its RBD with the cholesterol transporter NPC1 (17, 18). Finally, an incompletely characterized, additional stimulus activates GP2 for membrane fusion (19), which results in the delivery of the viral nucleocapsid into the host cell cytoplasm.

Several host cell factors have been implicated in the cellular entry of ebolaviruses: Binding of calcium-dependent lectins like DC-SIGN (20, 21) to glycans on the surface of GP can concentrate virions onto target cells and can thereby enhance GP-driven entry (22). In addition, certain integrins were found to promote GP-mediated entry and evidence for GP binding to these factors was obtained (23). Furthermore, TAM receptor tyrosine kinases (Tyro3, Axl, Mer,) were shown to promote GP-mediated entry (24), potentially by stimulating viral uptake via macropinocytosis (25). Direct interactions between TAM receptors and GP have not been detected. Two members of the TIM protein family, TIM-1 and TIM-4, were also

shown to promote viral entry, and binding of GP to TIM-1 has been demonstrated (26). However, binding to GP might not account for TIM-1 mediated augmentation of GP-driven entry. Thus, TIM proteins directly (27) and TAM receptors indirectly (28) bind to phosphatidylserine (PtdSer) on apoptotic cells, and binding to PtdSer on the virion surface was shown to be important for augmentation of GP-driven entry (25, 29-33). A single study provided evidence for a role of folate receptor in GP-mediated entry (34) but these findings have been refuted by other studies (35, 36). Finally, NPC1 has been identified as an endosomal binding partner for GP (17-19), as outlined above. However, many of the above mentioned studies focussed on the analysis of cell lines while the cellular factors required for entry of ebolaviruses into macrophages, the major viral target cells, are poorly defined.

Here, we employed lentiviral vectors pseudotyped with GP and siRNAs to characterize cellular factors required for GP-driven entry into cell lines and macrophages. Our results confirm that TIM-1 and Axl promote GP-mediated transduction of certain cell lines and show that these factors do not contribute to GP-driven entry into macrophages. In contrast, NPC1 was found to be universally required for GP-dependent transduction of cell lines and macrophages. Finally, we show that integrin αV and Mer contribute to GP-driven transduction and Zaire ebolavirus infection of macrophages and we provide evidence that expression of scavenger receptor A (SR-A) might also be required for these processes.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

All adherent cell lines cells were maintained in DMEM (Life Technologies) and all suspension cells in RPMI1640 medium (PAA), supplemented with 5-10 % fetal bovine serum (FCS; Biochrom) and 1 % penicillin/ streptomycin sulfate. Differentiation of THP-1 monocytes into macrophages was achieved by exposure to 10 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma) for 48 h. Primary human monocyte-derived macrophages were cultured in monocyte differentiation medium: X-VIVO 10 (Lonza) supplemented with 1 % human fibrin-depleted plasma and 1 %

penicillin/ streptomycin sulfate. All cells were grown in a humidified atmosphere at 37 °C and 5 % CO₂.

Generation of primary monocyte-derived macrophages

Primary monocyte-derived macrophages (MDM) were prepared from thrombocyte-depleted blood from healthy human donors by Ficoll density gradient centrifugation. Buffy coats were washed three times in PBS and resuspended in monocyte adhesion medium (RPMI1640 supplemented with 7.5 % human fibrin-depleted plasma and 1 % penicillin/ streptomycin sulfate) and seeded into 15-cm tissue-culture dishes. After 45-90 min of incubation, non-adherent cells were removed by extensive washing and the adherent cells were incubated in monocyte adhesion medium. The next day, cells were detached with Accutase (Life Technologies) and seeded into cell culture plates for differentiation into macrophages by culture in monocyte differentiation medium for seven days. During culture, the cell culture medium was exchanged every 2-3 days. Differentiation into macrophages was controlled by analyzing CD14 expression. For this, cells were harvested, washed and incubated either with FITC-labelled mouse anti-human CD14 antibody or an isotype matched control antibody (BD Biosciences) for 1h. After washing, cells were fixed with 2% paraformaldehyde and staining analysed by FACS (LSRII, BD).

Plasmids and antibodies

Expression plasmids for the glycoproteins of Zaire ebolavirus (EBOV-GP), EBOV-GP with deleted mucin domain (EBOV-GP Δ muc) and vesicular stomatitis virus (VSV-G) as well as plasmids encoding for the surface units of EBOV-GP and the SARS-coronavirus spike protein fused to the Fc portion of human immunoglobulin have been described previously (37, 38). Plasmids encoding the lectins DC-SIGN (39), DC-SIGNR (39), LSECtin (37), ASGPR-1 (40) and Clec5A (41) and plasmids encoding Mer (42), NPC1-3xFLAG (17) and folate receptor alpha (FR- α) (35) were also described previously. The plasmid encoding Axl was purchased (ImageGenes). Expression plasmids for human TIM-1, TIM-4 and SR-A were generated by RT-PCR amplification of the respective coding sequences from RNA isolated from Huh7 cells (TIM-1), activated human PBMCs (TIM-4) or THP1

monocytes (SR-A) followed by insertion of the PCR products into the pCAGGS plasmid. The pCAGGS-TIM-3 plasmid was generated by excising the TIM-3 coding sequence from plasmid pcDNA3-human TIM-3 (43) and ligating it into pCAGGS. The integrity of all PCR amplified sequences was confirmed by automated sequence analysis.

The antibodies directed against TIM-1, Axl, folate receptor alpha (FR- α), ACE2 and Mer were purchased from R&D systems. The DC-SIGN antibody (mAb 526) was described previously (39) and obtained via the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program.

Glycoprotein binding assay

For analysis of glycoprotein binding to target cells a previously described assay has been employed (37). Briefly, 293T cells were calcium phosphate-transfected with plasmids encoding potential entry factors and either analyzed for expression of these factors or employed for GP binding studies. Expression of entry factors on the transfected cells was analyzed by staining with specific primary antibodies, followed by detection of bound antibodies with Alexa Fluor 647- or Cy5-labeled secondary antibodies (Invitrogen, Dianova), fixation of cells with 2% paraformaldehyde (PFA) and FACS analysis. For assessment of GP binding, the cells were detached at 24 h post transfection and incubated with concentrated cellular supernatants containing comparable amounts (as determined by Western blot analysis) of the EBOV-GP1 and SARS-S1 proteins subunits fused to Fc portion of human immunoglobulin. After extensive washing, cells were stained with FITC labelled anti-human secondary antibody (Dianova) and analyzed by FACS.

Analysis of siRNA-mediated knock-down of Mer and SR-A expression

To detect the impact of siRNAs on Mer expression, THP-1 cells were differentiated into macrophages by PMA treatment. At 48 h post PMA treatment, cells were siRNA transfected as described below and incubated for 24 h. Finally, cells were detached and expression of Mer analyzed by FACS. Western blot analysis was employed to determine the impact of siRNAs on SR-A expression in macrophages. For this, MDM were siRNA transfected as described below, incubated for 24 h and

then lysed in RIPA buffer. Lysates were incubated for 1 h at 42°C prior loading onto SDS gels. Upon separation of proteins by SDS gel electrophoresis, the proteins were blotted onto nitrocellulose membranes (Hartenstein), the membranes blocked in 5% milk and SR-A was detected with a SR-A specific antibody (R&D systems) and anti-mouse HRP secondary antibody (Jackson Research), both diluted in milk. Signal intensities were quantified using the Image J program.

RT-PCR

For analysis of NPC1 expression by RT-PCR, RNA was isolated from the indicated human cell lines by a commercially available kit (Qiagen), and 100 ng RNA was reversely transcribed into cDNA with random hexamers using a commercially available kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Thereafter, the NPC1 sequence was amplified using oligonucleotides p5-NPC1 5'-GAGTTACAATACTACGTCGGACAG-3' and p3-NPC1 5'-CCGTTTTCTGTAGCACCACACTGC-3'. Amplification of GAPDH served as a control for the integrity of the RNA. The absence of contaminating genomic DNA was confirmed by omission of RT enzyme during reverse transcription.

For detection of TIM-1, Axl and NPC1 transcripts by quantitative RT-PCR, RNA was extracted from HeLa, Huh7 and C81-66 cells and human macrophages as described above and analyzed using an ABI 7500 FAST real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad). The PCR reaction contained 0.5 µg total cellular RNA in a volume of 10 µl. Specific amplification was ensured with TaqMan gene expression assays (catalog number 4448892; Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. The following specific assays were used: Hs03054852_g1 (TIM-1), Hs01064444_m1 (Axl) and Hs00264835_m1 (NPC-1) as well as Hs99999908_m1 (β-glucuronidase [GUSB]). The average cycle threshold value (CT) for each individual assay was calculated from triplicate measurements by means of the instrument's software in the auto CT mode (7500 FAST System Software, version 1.3.0). Average CT values calculated for TIM-1, Axl and NPC1 were normalized by subtraction from the CT values obtained for the housekeeping

reference GUSB. Template-free cDNA reactions were analyzed in parallel using the same TaqMan assays; no specific signal was detected in any of these experiments.

Production of lentiviral pseudotypes

The generation of lentiviral vectors pseudotyped with heterologous viral glycoproteins (pseudotypes) was carried out as described before (21). In brief, 293T cells were calcium phosphate-transfected with an expression plasmid encoding the glycoprotein of choice in combination with plasmid pNL4-3 E⁻N⁻, which encodes an env-defective, HIV-1-derived vector containing luciferase in place of nef (44). Alternatively, a three-component HIV-1 based pseudotyping system was used (45). At 8 h post transfection, the transfection medium (culture medium supplemented with transfection reagents) was replaced by fresh culture medium and at 48 h post transfection supernatants were harvested, passed through 0.45 µm pore-size filters, aliquotted and stored at -80°C. Finally, the vector preparations were normalized for infectivity by inoculating 293T cells or macrophages with serial dilutions of vector preparations followed by the determination of luciferase activities (Promega) in cell lysates at 72 h post transduction.

Transduction experiments

For transduction experiments, adherent cells were seeded in 96-well plates at a density of 3×10^4 cells/ well. Monocytes were seeded and differentiated into MDM in 96-well plates at a density of 7.5×10^4 cells/ well. Cells were then incubated for 8 h with 50 µl of medium containing infectivity-normalized vector preparations. MDM were spinoculated at 2000 rpm and 21°C for 2 h and then incubated at 37°C for 6 h. Subsequently, the infection medium (culture medium containing vector preparations) was replaced by fresh culture medium. Transduction efficiency was determined by quantifying luciferase activities in cell lysates at 72 h post transduction, using a commercially available kit (Promega).

To assess the impact of siRNA knock-down on transduction, target cells were lipofectamine (Invitrogen) transfected with 5 pmol siRNAs (Santa Cruz) at 24 h before transduction. To determine whether U18666A (Biomol), Imipramine, mannan, N-acetylglucosamine (GlcNAc), Fucoidan, and Wortmannin (all Sigma-Aldrich)

modulated transduction efficiency, the inhibitors were diluted in solvents as recommended by the manufacturer and incubated with target cells for 30-60 min at 37°C before addition of pseudotypes. After incubation for 8-12 h the inhibitor-containing medium was replaced by fresh culture medium without inhibitor. Culture of the cells was continued until 72 h post transduction, when transduction efficiency was determined by quantifying luciferase activities in cell lysates.

Infection experiments with Zaire ebolavirus

All experiments with replication competent Zaire ebolavirus (EBOV) were performed in the BSL-4 facility of the Institute of Virology at the Philipps-University Marburg. MDM seeded in 8-well chamber slides (ibidi) were transfected with siRNA in duplicates as described above and 24 h later infected with EBOV (Mayinga strain) at an MOI of 10, as determined on Vero cells. Inoculum was replaced by fresh culture medium at 1 h post infection and infection was stopped after 16 h by treatment of cells with medium containing 4% PFA. After inactivation by PFA, cells were with 0.1% Triton X 100, blocked with 100mM glycine in PBS and incubated with an NP-antibody (46). Unbound antibody was removed by washing and bound antibody detected with a DyLight488-coupled secondary antibody (Abcam). Additionally, nuclei were DAPI-stained. To determine infection efficiency, pictures of each well were taken with an automated microscope and the number of NP-positive cells relative to the total number of cells (defined by DAPI positivity) was determined.

RESULTS

Lectins, TIM proteins and TAM receptor tyrosine kinases are expressed on the surface of certain ebolavirus target cells and were previously implicated in host cell entry of these viruses (20, 24, 26). In order to confirm and extend these observations, we compared the ability of lectins, TIM proteins and the TAM family member Axl to augment ebolavirus glycoprotein-driven entry into permissive cells. We chose 293T cells for these analyses, since this cell line can be efficiently transfected and is highly susceptible to transduction mediated by ebolavirus glycoproteins (21). For transduction, we opted for pseudotypes bearing the glycoprotein (GP) of the highly

pathogenic Zaire ebolavirus (EBOV) and an EBOV-GP variant lacking the mucin-domain (EBOV-GP Δ muc), which was reported to yield higher vector titres than the wt protein (47).

Control pseudotypes bearing no glycoprotein were unable to transduce 293T cells while transduction mediated by VSV-G and EBOV-GP as well as EBOV-GP Δ muc was efficient. Transduction mediated by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus (VSV-G) was not modulated when the cells were transfected to express lectins (Fig. 1A), as expected (21). In contrast, the expression of the C-type lectins DC-SIGN, DC-SIGNR, ASGPR-1 and LSECtin increased EBOV-GP- and EBOV-GP Δ muc-mediated transduction up to 37-fold (Fig. 1A), in keeping with published data (20, 21, 37, 40). A noticeable increase in transduction efficiency was also observed upon expression of TIM-1 while expression of TIM-4 and Axl had no effect on transduction mediated by EBOV-GP but slightly enhanced transduction driven by EBOV-GP Δ muc (Fig. 1B). Finally, expression of folate receptor α (FR- α), TIM-3 and CLEC5A, a lectin that interacts with dengue virus (48), did not modulate transduction under all conditions tested. These results demonstrate that expression of certain lectins and TIM-1 on a susceptible cell line can increase EBOV-GP-driven entry, supporting a role of these proteins in host cell entry of ebolaviruses. Moreover, our results show that deletion of the mucin domain might augment Axl- and TIM-4-promoted host cell entry.

DC-SIGN but not TIM-1 and Axl bind to the GP1 unit of the ebolavirus glycoprotein. We next tested whether the entry factors examined in our study directly interact with the GP1 subunit of the EBOV-GP, which harbours the RBD. For this, the GP1 subunit of EBOV-GP was fused to the Fc portion of human immunoglobulin and binding to 293T cells transfected to express DC-SIGN, TIM-1, Axl and FR- α was examined. The S1 subunit of the SARS-coronavirus spike protein (SARS-S1) is known to bind to DC-SIGN and the receptor ACE2 (49) and was used as positive control. The Fc protein alone was employed as negative control.

The expression of all entry factors tested was readily detectable on the transfected cells as determined by FACS analysis (Fig. 2A). Binding of SARS-S1-Fc

to DC-SIGN and ACE2 expressing cells was markedly above the background signal measured for the Fc portion alone (Fig. 2B), as expected (49, 50). The EBOV-GP1 subunit was also able to bind to DC-SIGN specifically, in keeping with published results (20, 21, 50), but binding to the other proteins tested was within the background range, at least under the conditions employed (Fig. 2B). Thus, augmentation of GP-driven host cell entry by lectins might rely on efficient binding to the GP1 subunit, resulting in virion concentration on the cell surface, in keeping with published data (22). In contrast, this mechanism is unlikely to account for the promotion of EBOV-GP-driven transduction by TIM-1 and Axl expression, in agreement with the concept that these factors augment EBOV-GP-driven entry by binding to PtdSer in the viral envelope (30, 33).

Augmentation of ebolavirus glycoprotein driven entry by TIM-1 and Axl is cell-line dependent. DC-SIGN is only expressed on a narrow spectrum of target cells of ebolavirus infection, including dendritic cells and certain tissue macrophages. Therefore, we focussed our subsequent analyses on TIM-1 and Axl, which are broadly expressed on cell lines, as confirmed by FACS analysis (Fig. 3A), and primary cells. However, a comparison between endogenous TIM-1 and Axl expression on cell lines and susceptibility to EBOV-GP and EBOV-GP Δ muc-driven transduction revealed no correlation (Fig. 3B). For instance, the cell lines 293T and RPE express very low amounts of endogenous Axl and TIM-1 but are highly susceptible to EBOV-GP-driven transduction (Fig. 3A, B). Similarly, siRNA-mediated knock-down of Axl expression on HeLa cells (Fig. 3C), which express endogenous Axl but not TIM-1, reduced EBOV-GP- and EBOV-GP Δ muc-driven transduction, while an siRNA against TIM-1 had no effect (Fig. 3D, upper panel). The reverse observation was made for Huh-7 cells, which express endogenous TIM-1 but not Axl (Figs. 3C and 3D, lower panel), indicating that augmentation of EBOV-GP-mediated transduction by Axl and TIM-1 is a cell type specific process, a finding that matches and extends previous results (25, 26).

NPC1 expression is required for ebolavirus glycoprotein driven transduction of different cell lines. The NPC1 protein is a ubiquitously expressed, intracellular ebolavirus entry factor, which interacts with proteolytically processed GP (17, 18).

We asked whether NPC1, in contrast to Axl and TIM-1, is universally required for EBOV-GP-mediated transduction. Indeed, knock-down of NPC1 expression reduced EBOV-GP- and EBOV-GP Δ muc-driven transduction of HeLa and Huh-7 cells (Fig. 4A) and treatment of U373, 293T, Huh-7 and RPE cells with U18666A, an inhibitor which induces an NPC1 knock-out phenotype in treated cells (PMID: 23441171), efficiently reduced EBOV-GP and EBOV-GP Δ muc-driven transduction (Fig. 4B). In contrast, U18666A had little effect on VSV-G-driven transduction. Finally, we explored if absence of NPC1 expression might be the reason why lymphocytes are not susceptible to EBOV-GP-driven transduction and EBOV infection (51). However, NPC1 mRNA was readily detected in C81-66 T lymphocytes and Raji B cells (Fig. 4C), which were resistant to EBOV-GP-driven transduction (Fig. 4D), indicating that lack of NPC1 does not account for resistance of lymphocytes to EBOV-GP-mediated entry.

NPC1 but not TIM-1 and Axl expression is required for ebolavirus glycoprotein mediated transduction of macrophages. Macrophages are targeted early and throughout ebolavirus infection (52-54). Therefore, we next asked whether Axl, TIM-1 and NPC1 contribute to GP-driven transduction of monocyte-derived macrophages (MDM). Quantitative RT-PCR analysis revealed that MDM express only low amounts Axl and TIM-1 when compared to the cell lines HeLa and Huh7 (Fig. 5A). In keeping with this finding, siRNA-mediated knock-down of Axl and TIM-1 expression had no appreciable effect on EBOV-GP-driven transduction of MDM (Fig. 5B). In contrast, knock-down of NPC1 significantly reduced MDM transduction mediated by EBOV-GP but not VSV-G. Similarly, transduction of MDM by EBOV-GP- but not VSV-G-bearing pseudotypes was reduced efficiently and in a concentration dependent manner by U18666A (Fig. 5C), indicating that NPC1 might be required for ebolavirus invasion of macrophages.

Mannose-specific lectins do not promote ebolavirus glycoprotein-driven transduction of macrophages. The macrophage mannose-receptor (MR) contributes to HIV capture by macrophages (55) and MR and other mannose-specific lectins might promote EBOV-GP-driven entry into MDM. We therefore asked whether an inhibitor targeting mannose-specific lectins, the mannose polymer mannan, might

block EBOV-GP-mediated transduction of MDM. Augmentation EBOV-GP-driven transduction of 293T cells upon DC-SIGN expression was largely abrogated when target cells were preincubated with mannan (Fig. 6A). In contrast, mannan did not inhibit transduction of MDM (Fig. 6B) and directed expression of mannose receptor on CHO cells did not promote EBOV-GP-mediated transduction (not shown). Thus, EBOV-GP does not engage mannose-specific lectins to promote entry into macrophages.

Evidence that integrin α V, SR-A and Mer expression is required for ebolavirus glycoprotein mediated transduction of macrophages. The results obtained so far indicated that from the previously identified ebolavirus entry factors only NPC1 is essential for efficient GP-mediated transduction of MDM. Notably, two of the factors required for optimal transduction of cell lines, Axl and TIM-1, are intimately involved in the recognition of apoptotic cells (27, 28). Therefore, we asked whether EBOV-GP might exploit other cellular factors with a comparable activity for macrophage invasion. We focused our analysis on integrin α V, CD14, CD36, LOX-1, scavenger receptor A (SR-A) and Mer, which are all known to be expressed in macrophages and to play a role in the detection of apoptotic cells (56). Moreover, integrin α V and Mer were previously implicated in EBOV-GP-mediated entry (23, 24). Transfection of siRNAs directed against integrin α V, SR-A and Mer expression significantly reduced EBOV-GP- but not VSV-G- mediated transduction of MDM (Fig. 7A). Moreover, a combination of siRNAs against Mer, SR-A and NPC1 reduced transduction more efficiently than the single siRNAs (Fig. 7B), suggesting that Mer, SR-A, NPC1 and integrin α V might all be required for robust EBOV-GP-mediated transduction of macrophages.

Specificity of inhibition of ebolavirus glycoprotein-driven transduction of macrophages by siRNAs against SR-A and Mer. In order to further evaluate the role of SR-A and Mer in EBOV-GP-driven transduction of macrophages, we next assessed the efficiency and specificity of the siRNA mediated knock-down of these factors. The effects of siRNA transfection on Mer expression were analysed using macrophages derived upon PMA treatment of the monocytic cell line THP-1, since Mer protein was readily detected on these cells but not on MDM, due to high

background signals measured for MDM. Mer expression was modestly reduced upon transfection of Mer- but not NPC1- or SR-A-specific siRNA (Fig. 8A). Similarly, expression of SR-A in MDM was reduced by siRNA specific for SR-A but not NPC1. Transfection of siRNA directed against Mer had a slight but reproducible effect on SR-A expression (Fig. 8A), suggesting that full expression of SR-A might depend on parallel expression of Mer, a scenario that is in keeping with published findings (57). To further investigate the specificity of the siRNAs directed against Mer and SR-A, we next employed HeLa cells, which do not express detectable levels of SR-A (58) and Mer (59). Transfection of siRNA directed against NPC1 markedly reduced transduction mediated by EBOV-GP but not VSV-G (Fig. 8B), as expected. In contrast, siRNA against Mer had no significant effect on EBOV-GP-mediated transduction and slightly augmented transduction driven by VSV-G. Finally, siRNA directed against SR-A reduced EBOV-GP- but not VSV-G-driven transduction by 45% (Fig. 8B), suggesting off target effects. To obtain independent evidence for a role of SR-A in EBOV-GP-mediated macrophage transduction, we finally asked whether tannic acid, which blocks ligand binding to SR-A (60), inhibits transduction. Indeed, tannic acid reduced EBOV-GP- but not VSV-G-mediated transduction of MDM in a robust and concentration dependent manner (Fig. 8C). Collectively, these results are in keeping with a role of SR-A and Mer in EBOV-GP-dependent macrophage transduction, although off target effects of the SR-A siRNA cannot be excluded.

Interference with Mer, SR-A and NPC1 expression reduces Zaire ebolavirus infection of macrophages. It is possible that GP-pseudotyped retroviral particles, which differ in form and size from authentic ebolaviruses, might not mirror all facets of ebolavirus entry into host cells. Therefore, we assessed whether the siRNAs directed against Mer and SR-A reduced MDM infection by replication competent Zaire ebolavirus. siRNA against integrin αV and NPC1 were also tested. Transfection of single siRNAs slightly but reproducibly decreased infection efficiency and a marked drop in the infection rate was observed upon parallel knock-down of Mer, SR-A and NPC1 (Fig. 9), indicating that the expression of NPC1 jointly with several

factors involved in the phagocytosis of apoptotic cells is required for efficient EBOV infection of macrophages.

DISCUSSION

Macrophages are early and sustained targets of ebolaviruses and infection of these cells is believed to play a pivotal role in viral spread and pathogenesis (53). Lectins, TIM family proteins, TAM receptor tyrosine kinases, integrins and NPC1 have been implicated in the infection of cell lines and certain primary cells by ebolaviruses (17, 18, 20, 24, 26), but it was unclear which factors contribute to macrophage invasion. Our results confirm that TIM-1 and Axl can promote GP-driven entry into certain cell lines and show that these proteins do not augment entry into macrophages. In contrast, we found that NPC1 was required for entry into macrophages and all cell lines tested. Finally, we provide evidence that also Mer, integrin α V and potentially SR-A promote EBOV invasion of macrophages.

Different target cells and viral vector systems have been employed to characterize host cell factors contributing to cellular entry of ebolaviruses. Therefore, we felt that a direct comparison of these factors for their ability to augment GP-driven entry into an already susceptible cell line, 293T, might allow interesting insights into their relative contribution to viral entry, mode of action and potential role in macrophage invasion. Of all factors tested, lectins were most efficient at increasing GP-driven entry into 293T cells, and a direct interaction of GP1 and DC-SIGN was demonstrated, in keeping with previous work (20, 21, 50). These observations underline that directed expression of lectins can profoundly augment GP-driven entry, most likely by concentrating virions onto target cells (22). However, it is less clear whether endogenously expressed lectins facilitate entry of ebolaviruses. Monocyte-derived dendritic cells express high levels of DC-SIGN (61) and directed expression of this lectin on susceptible cell lines can increase GP-mediated entry up to 40-fold (20, 21). Nevertheless, inhibition of DC-SIGN and other mannose-specific lectins reduced EBOV infection of MDDCs only about 2-fold (22). Similarly, the present study demonstrates that mannose-specific lectins do not promote GP-driven

entry into monocyte-derived macrophages (MDM). In keeping with this finding, our results indicate that directed expression of MR, a mannose-binding lectin expressed on MDM and able to capture HIV (55), does not augment GP-driven entry into a cell line (not shown). Collectively, these results argue against a major contribution of mannose-specific lectins to ebolavirus entry into macrophages and dendritic cells. However, one should keep in mind that although MDM are DC-SIGN negative, certain tissue macrophages do express this lectin (62, 63) and might therefore be preferentially infected in the host. Moreover, it is unknown whether lectins like hMGL, LSECtin and ASGPR1, which recognize carbohydrates other than mannose and augment EBOV-GP-driven infection in cell culture (37, 40, 64), impact the viral cell tropism in vivo. Knock-out mice might be the most suitable tool to address this question. For instance, animals lacking mSIGNR1 (65), a murine homologue of DC-SIGN, which is expressed on macrophages and augments EBOV-GP-driven entry into transfected cells (66), are available and could be analysed upon infection with mouse-adapted EBOV.

Shimajima and colleagues (24) and Kondratowicz and co-workers (26) identified a role of TAM receptor kinases and TIM proteins in the entry of ebolaviruses into certain target cells. The entry-promoting activity of these proteins has been linked to their ability to bind to PtdSer in the viral envelope (25, 29-33), either directly (TIM proteins) or indirectly via the bridging molecules Gas6 and protein S (TAM receptor kinases). As a consequence of PtdSer binding, TAM receptor tyrosine kinases and TIM proteins can augment entry of different viruses without interacting with the viral envelope proteins (29, 30, 33, 67). Upon expression in 293T cells, TIM-1 but no other TIM protein or Axl increased EBOV-GP wt-mediated entry. Notably, augmentation of GP-driven entry upon TIM-1 expression was more pronounced for EBOV-GP Δ muc compared to EBOV-GP wt and expression of Axl and TIM-4 consistently increased entry driven EBOV-GP Δ muc but not EBOV-GP wt, although with low efficiency. Thus, the presence of the mucin-like domain might modulate augmentation of GP-driven transduction by PtdSer binding proteins. Why expression of TIM-3, which can also bind to PtdSer, did not augment entry is at present unclear but might be due to the particular spatial presentation of its PtdSer

binding domain. Similarly, it is currently unclear why expression of TIM-1 augments entry driven by EBOV-GP but not VSV-G (and a few other viral glycoproteins), a finding also made by other investigators (29). Several hypotheses have been put forward to explain this observation, including masking of the entry promoting activity of PtdSer receptors by high-affinity binding of viral glycoproteins to cellular receptors and sterical interference of certain viral glycoproteins with PtdSer binding (29, 33).

Our finding that augmentation of GP-driven entry by endogenously expressed TIM-1 and Axl is cell type-dependent matched previous reports (26, 32) and raised the questions whether these factors contribute to GP-mediated entry into macrophages. Quantitative RT-PCR revealed that less Axl and TIM-1 mRNA is produced in MDM compared to susceptible cell lines, and siRNA-knock-down showed that expression of these factors is dispensable for GP-driven entry into MDM. The expression of Mer but not Axl or Tyro3 is essential for efficient phagocytosis of apoptotic cells by macrophages (68), suggesting that Mer is the TAM receptor kinase active in macrophages. Our observation that knock-down of Mer but not Axl decreased GP-driven MDM transduction and EBOV infection of MDM matches these findings. Thus, Mer but not Axl or TIM-1 can promote macrophage invasion by ebolaviruses.

Several previous reports indicate a key role of NPC1 in host cell entry of ebolaviruses (17-19). Our finding that NPC1 was required for GP-mediated transduction of all target cells tested and was essential for efficient EBOV infection of macrophages may therefore not be unexpected. In this regard, it should be noted that the lymphocytic cell lines examined here expressed robust levels of NPC1 mRNA, suggesting that lack of NPC1 expression does not account for the resistance of lymphocytes to GP-driven entry. Finally, no evidence for a role of FR- α in EBOV was observed, a finding that confirms two previous reports (35, 36). Thus, NPC1 seems to be universally required for host cell invasion by ebolaviruses while FR- α does not contribute to this process.

The relatively modest effect of Mer knock-down on GP-driven entry into MDM and EBOV invasion of MDM suggested that other factors might contribute to these

processes and we speculated that they may also recognize apoptotic cells. Indeed, out of six factors tested, we found that siRNAs against integrin αV and SR-A reduced GP-driven entry and EBOV infection of MDM. Integrins $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ interact with MFG-E8, which in turn recognizes PtdSer (69), suggesting that these factors might promote GP-driven entry in a similar fashion as TAM receptor kinases and Gas6/protein S (67). Such a scenario could be reconciled with a previous study reporting that recombinant $\alpha 5\beta 1$ integrin or antibodies against $\beta 1$ integrin interfere with GP-driven entry (23). However, subsequent work indicated that expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin is required for full activity of cathepsin L, which processes GP for binding to NPC1 (23, 70). Integrin αV expression might thus promote macrophage entry of ebolaviruses via several mechanisms.

SR-A is expressed in macrophages and dendritic cells and contributes to the macrophage uptake of a broad spectrum of ligands, including apoptotic cells (71). The GP1 subunit of EBOV-GP did not bind to cells expressing SR-A (not shown) but treatment of MDM with siRNA directed against SR-A consistently reduced EBOV-GP- but not VSV-G-driven entry as well as EBOV infection. Furthermore, GP-driven transduction was also inhibited by incubation of MDM with tannic acid, a SR-A ligand (60), arguing for a role of SR-A in entry of ebolaviruses into macrophages. On the other hand, siRNA against SR-A also reduced GP-driven entry into HeLa cells, which do not express endogenous SR-A (58), and alveolar macrophages isolated from SR-A knock-out and wt mice were equally susceptible to GP-driven transduction (not shown). Further studies are therefore required to fully define the potential role of SR-A in macrophage entry of ebolaviruses.

Collectively, our results support the concept that ebolaviruses use apoptotic mimicry for invasion of cell lines and macrophages and suggest that the set of factors exploited by the viruses for this purpose may be cell type-dependent. It will be interesting to examine if some of the factors explored here may constitute targets for antiviral intervention.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. O`Callaghan for CLEC5A expression plasmid, H.S. Earp for Mer expression plasmid, W. Kuehn for TIM-3 expression plasmid, K. Chandran for NPC1 expression plasmid and G. Simmons for FR-A expression plasmid. We also thank Andrea Büscher for excellent technical assistance, T. Legler for supplying thrombocyte-depleted blood and F.J. Kaup for support.

REFERENCES

1. **Feldmann, H. and T. W. Geisbert.** 2011. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* **377**:849-862.
2. **MacNeil, A. and P. E. Rollin.** 2012. Ebola and Marburg hemorrhagic fevers: neglected tropical diseases? *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **6**:e1546.
3. **Leroy, E. M., J. P. Gonzalez, and S. Baize.** 2011. Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:964-976.
4. **Taniguchi, S., S. Watanabe, J. S. Masangkay, T. Omatsu, T. Ikegami, P. Alviola, N. Ueda, K. Iha, H. Fujii, Y. Ishii, T. Mizutani, S. Fukushi, M. Saijo, I. Kurane, S. Kyuwa, H. Akashi, Y. Yoshikawa, and S. Morikawa.** 2011. Reston Ebolavirus antibodies in bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* **17**:1559-1560.
5. **Barrette, R. W., S. A. Metwally, J. M. Rowland, L. Xu, S. R. Zaki, S. T. Nichol, P. E. Rollin, J. S. Towner, W. J. Shieh, B. Batten, T. K. Sealy, C. Carrillo, K. E. Moran, A. J. Bracht, G. A. Mayr, M. Sirios-Cruz, D. P. Catbagan, E. A. Lautner, T. G. Ksiazek, W. R. White, and M. T. McIntosh.** 2009. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science* **325**:204-206.
6. **Miranda, M. E. and N. L. Miranda.** 2011. Reston ebolavirus in humans and animals in the Philippines: a review. *J. Infect. Dis.* **204 Suppl 3**:S757-S760.
7. 1996. Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates--Texas, 1996. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **45**:314-316.

8. **Geisbert, T. W., P. B. Jahrling, M. A. Hanes, and P. M. Zack.** 1992. Association of Ebola-related Reston virus particles and antigen with tissue lesions of monkeys imported to the United States. *J. Comp Pathol.* **106**:137-152.
9. **Le, G. B., P. Formenty, M. Wyers, P. Gounon, F. Walker, and C. Boesch.** 1995. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet* **345**:1271-1274.
10. **Hofmann-Winkler, H., F. Kaup, and S. Pohlmann.** 2012. Host cell factors in filovirus entry: novel players, new insights. *Viruses.* **4**:3336-3362.
11. **Neumann, G., H. Feldmann, S. Watanabe, I. Lukashevich, and Y. Kawaoka.** 2002. Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J. Virol.* **76**:406-410.
12. **Neumann, G., T. W. Geisbert, H. Ebihara, J. B. Geisbert, K. M. Daddario-DiCaprio, H. Feldmann, and Y. Kawaoka.** 2007. Proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not critical for Ebola virus replication in nonhuman primates. *J. Virol.* **81**:2995-2998.
13. **Volchkov, V. E., H. Feldmann, V. A. Volchkova, and H. D. Klenk.** 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:5762-5767.
14. **Sanchez, A., Z. Y. Yang, L. Xu, G. J. Nabel, T. Crews, and C. J. Peters.** 1998. Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J. Virol.* **72**:6442-6447.
15. **Kuhn, J. H., S. R. Radoshitzky, A. C. Guth, K. L. Warfield, W. Li, M. J. Vincent, J. S. Towner, S. T. Nichol, S. Bavari, H. Choe, M. J. Aman, and M. Farzan.** 2006. Conserved receptor-binding domains of Lake Victoria marburgvirus and Zaire ebolavirus bind a common receptor. *J. Biol. Chem.* **281**:15951-15958.
16. **Chandran, K., N. J. Sullivan, U. Felbor, S. P. Whelan, and J. M. Cunningham.** 2005. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**:1643-1645.
17. **Carette, J. E., M. Raaben, A. C. Wong, A. S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A. I. Kuehne, P. J. Kranzusch, A. M. Griffin, G. Ruthel, C. P. Dal, J. M. Dye, S. P. Whelan, K. Chandran, and T. R. Brummelkamp.** 2011.

Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **477**:340-343.

18. **Cote, M., J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C. M. Filone, L. Hensley, Q. Li, D. Ory, K. Chandran, and J. Cunningham.** 2011. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* **477**:344-348.
19. **Miller, E. H., G. Obernosterer, M. Raaben, A. S. Herbert, M. S. Deffieu, A. Krishnan, E. Ndungo, R. G. Sandesara, J. E. Carette, A. I. Kuehne, G. Ruthel, S. R. Pfeffer, J. M. Dye, S. P. Whelan, T. R. Brummelkamp, and K. Chandran.** 2012. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J.* **31**:1947-1960.
20. **Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, and R. Delgado.** 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J. Virol.* **76**:6841-6844.
21. **Simmons, G., J. D. Reeves, C. C. Grogan, L. H. Vandenberghe, F. Baribaud, J. C. Whitbeck, E. Burke, M. J. Buchmeier, E. J. Soilleux, J. L. Riley, R. W. Doms, P. Bates, and S. Pohlmann.** 2003. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* **305**:115-123.
22. **Marzi, A., P. Moller, S. L. Hanna, T. Harrer, J. Eisemann, A. Steinkasserer, S. Becker, F. Baribaud, and S. Pohlmann.** 2007. Analysis of the interaction of Ebola virus glycoprotein with DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) and its homologue DC-SIGNR. *J. Infect. Dis.* **196 Suppl 2**:S237-S246.
23. **Takada, A., S. Watanabe, H. Ito, K. Okazaki, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2000. Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* **278**:20-26.
24. **Shimojima, M., A. Takada, H. Ebihara, G. Neumann, K. Fujioka, T. Irimura, S. Jones, H. Feldmann, and Y. Kawaoka.** 2006. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J. Virol.* **80**:10109-10116.
25. **Hunt, C. L., A. A. Kolokoltsov, R. A. Davey, and W. Maury.** 2011. The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *J. Virol.* **85**:334-347.

26. **Kondratowicz, A. S., N. J. Lennemann, P. L. Sinn, R. A. Davey, C. L. Hunt, S. Moller-Tank, D. K. Meyerholz, P. Rennert, R. F. Mullins, M. Brindley, L. M. Sandersfeld, K. Quinn, M. Weller, P. B. McCray, Jr., J. Chiorini, and W. Maury.** 2011. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**:8426-8431.
27. **Freeman, G. J., J. M. Casasnovas, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff.** 2010. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **235**:172-189.
28. **Nguyen, K. Q., W. I. Tsou, S. Kotenko, and R. B. Birge.** 2013. TAM receptors in apoptotic cell clearance, autoimmunity, and cancer. *Autoimmunity* **46**:294-297.
29. **Jemielity, S., J. J. Wang, Y. K. Chan, A. A. Ahmed, W. Li, S. Monahan, X. Bu, M. Farzan, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, and H. Choe.** 2013. TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. *PLoS. Pathog.* **9**:e1003232.
30. **Moller-Tank, S., A. S. Kondratowicz, R. A. Davey, P. D. Rennert, and W. Maury.** 2013. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *J. Virol.* **87**:8327-8341.
31. **Shimojima, M., Y. Ikeda, and Y. Kawaoka.** 2007. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* **196 Suppl 2**:S259-S263.
32. **Brindley, M. A., C. L. Hunt, A. S. Kondratowicz, J. Bowman, P. L. Sinn, P. B. McCray, Jr., K. Quinn, M. L. Weller, J. A. Chiorini, and W. Maury.** 2011. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology* **415**:83-94.
33. **Morizono, K., Y. Xie, T. Olafsen, B. Lee, A. Dasgupta, A. M. Wu, and I. S. Chen.** 2011. The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry. *Cell Host. Microbe* **9**:286-298.
34. **Chan, S. Y., C. J. Empig, F. J. Welte, R. F. Speck, A. Schmaljohn, J. F. Kreisberg, and M. A. Goldsmith.** 2001. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* **106**:117-126.

35. **Simmons, G., A. J. Rennekamp, N. Chai, L. H. Vandenberghe, J. L. Riley, and P. Bates.** 2003. Folate receptor alpha and caveolae are not required for Ebola virus glycoprotein-mediated viral infection. *J. Virol.* **77**:13433-13438.
36. **Sinn, P. L., M. A. Hickey, P. D. Staber, D. E. Dylla, S. A. Jeffers, B. L. Davidson, D. A. Sanders, and P. B. McCray, Jr.** 2003. Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *J. Virol.* **77**:5902-5910.
37. **Gramberg, T., H. Hofmann, P. Moller, P. F. Lalor, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel, T. Winkler, F. Kirchhoff, D. H. Adams, S. Becker, J. Munch, and S. Pohlmann.** 2005. LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology* **340**:224-236.
38. **Marzi, A., A. Akhavan, G. Simmons, T. Gramberg, H. Hofmann, P. Bates, V. R. Lingappa, and S. Pohlmann.** 2006. The signal peptide of the ebolavirus glycoprotein influences interaction with the cellular lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* **80**:6305-6317.
39. **Pohlmann, S., E. J. Soilleux, F. Baribaud, G. J. Leslie, L. S. Morris, J. Trowsdale, B. Lee, N. Coleman, and R. W. Doms.** 2001. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:2670-2675.
40. **Lin, G., G. Simmons, S. Pohlmann, F. Baribaud, H. Ni, G. J. Leslie, B. S. Haggarty, P. Bates, D. Weissman, J. A. Hoxie, and R. W. Doms.** 2003. Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* **77**:1337-1346.
41. **Watson, A. A., A. A. Lebedev, B. A. Hall, A. E. Fenton-May, A. A. Vagin, W. Dejnirattisai, J. Felce, J. Mongkolsapaya, A. S. Palma, Y. Liu, T. Feizi, G. R. Screaton, G. N. Murshudov, and C. A. O'Callaghan.** 2011. Structural flexibility of the macrophage dengue virus receptor CLEC5A: implications for ligand binding and signaling. *J. Biol. Chem.* **286**:24208-24218.
42. **Mahajan, N. P., Y. E. Whang, J. L. Mohler, and H. S. Earp.** 2005. Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox. *Cancer Res.* **65**:10514-10523.

43. **van de Weyer, P. S., M. Muehlfeit, C. Klose, J. V. Bonventre, G. Walz, and E. W. Kuehn.** 2006. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**:571-576.
44. **Connor, R. I., B. K. Chen, S. Choe, and N. R. Landau.** 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**.
45. **Gierer, S., S. Bertram, F. Kaup, F. Wrensch, A. Heurich, A. Kramer-Kuhl, K. Welsch, M. Winkler, B. Meyer, C. Drosten, U. Dittmer, T. von Hahn, G. Simmons, H. Hofmann, and S. Pohlmann.** 2013. The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *Journal of virology* **87**.
46. **Biedenkopf, N., B. Hartlieb, T. Hoenen, and S. Becker.** 2013. Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication. *J. Biol. Chem.* **288**:11165-11174.
47. **Kaletsky, R. L., G. Simmons, and P. Bates.** 2007. Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity. *J. Virol.* **81**:13378-13384.
48. **Chen, S. T., Y. L. Lin, M. T. Huang, M. F. Wu, S. C. Cheng, H. Y. Lei, C. K. Lee, T. W. Chiou, C. H. Wong, and S. L. Hsieh.** 2008. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* **453**:672-676.
49. **Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe, and M. Farzan.** 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**:450-454.
50. **Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Moller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann, and S. Pohlmann.** 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **78**:12090-12095.

51. **Wool-Lewis, R. J. and P. Bates.** 1998. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J. Virol.* **72**:3155-3160.
52. **Geisbert, T. W., L. E. Hensley, T. Larsen, H. A. Young, D. S. Reed, J. B. Geisbert, D. P. Scott, E. Kagan, P. B. Jahrling, and K. J. Davis.** 2003. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am. J. Pathol.* **163**:2347-2370.
53. **Martinez, O., L. W. Leung, and C. F. Basler.** 2012. The role of antigen-presenting cells in filoviral hemorrhagic fever: gaps in current knowledge. *Antiviral Res.* **93**:416-428.
54. **Ryabchikova, E. I., L. V. Kolesnikova, and S. V. Luchko.** 1999. An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* **179 Suppl 1**:S199-S202.
55. **Nguyen, D. G. and J. E. Hildreth.** 2003. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur. J. Immunol.* **33**:483-493.
56. **Devitt, A. and L. J. Marshall.** 2011. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J. Leukoc. Biol.* **90**:447-457.
57. **Liao, D., X. Wang, M. Li, P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen.** 2009. Human protein S inhibits the uptake of AcLDL and expression of SR-A through Mer receptor tyrosine kinase in human macrophages. *Blood* **113**:165-174.
58. **Rechner, C., C. Kuhlewein, A. Muller, H. Schild, and T. Rudel.** 2007. Host glycoprotein Gp96 and scavenger receptor SREC interact with PorB of disseminating *Neisseria gonorrhoeae* in an epithelial invasion pathway. *Cell Host. Microbe* **2**:393-403.
59. **Li, Y., N. P. Mahajan, J. Webster-Cyriaque, P. Bhende, G. K. Hong, H. S. Earp, and S. Kenney.** 2004. The C-mer gene is induced by Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1. *J. Virol.* **78**:11778-11785.
60. **Raycroft, M. T., B. P. Harvey, M. J. Bruck, and M. J. Mamula.** 2012. Inhibition of antigen trafficking through scavenger receptor A. *J. Biol. Chem.* **287**:5310-5316.

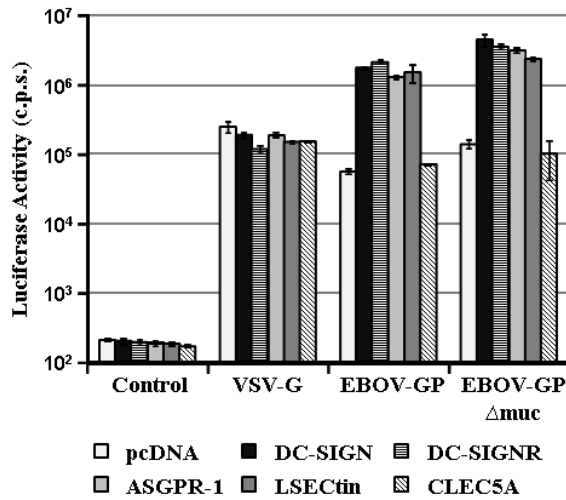
61. **Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and K. Y. van.** 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-597.
62. **Krutzik, S. R., B. Tan, H. Li, M. T. Ochoa, P. T. Liu, S. E. Sharfstein, T. G. Graeber, P. A. Sieling, Y. J. Liu, T. H. Rea, B. R. Bloom, and R. L. Modlin.** 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* **11**:653-660.
63. **Graneli-Piperno, A., A. Pritsker, M. Pack, I. Shimeliovich, J. F. Arrighi, C. G. Park, C. Trumpfheller, V. Piguet, T. M. Moran, and R. M. Steinman.** 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J. Immunol.* **175**:4265-4273.
64. **Takada, A., K. Fujioka, M. Tsuiji, A. Morikawa, N. Higashi, H. Ebihara, D. Kobasa, H. Feldmann, T. Irimura, and Y. Kawaoka.** 2004. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J. Virol.* **78**:2943-2947.
65. **Kang, Y. S., Y. Do, H. K. Lee, S. H. Park, C. Cheong, R. M. Lynch, J. M. Loeffler, R. M. Steinman, and C. G. Park.** 2006. A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell* **125**:47-58.
66. **Gramberg, T., I. Caminschi, A. Wegele, H. Hofmann, and S. Pohlmann.** 2006. Evidence that multiple defects in murine DC-SIGN inhibit a functional interaction with pathogens. *Virology* **345**:482-491.
67. **Morizono, K. and I. S. Chen.** 2014. The role of phosphatidylserine receptors in enveloped virus infection. *J. Virol.*
68. **Scott, R. S., E. J. McMahon, S. M. Pop, E. A. Reap, R. Caricchio, P. L. Cohen, H. S. Earp, and G. K. Matsushima.** 2001. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**:207-211.
69. **Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu, and S. Nagata.** 2002. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**:182-187.

70. **Schorberg, K. L., C. J. Shoemaker, D. Dube, M. Y. Abshire, S. E. Delos, A. H. Bouton, and J. M. White.** 2009. Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**:8003-8008.
71. **Platt, N., H. Suzuki, Y. Kurihara, T. Kodama, and S. Gordon.** 1996. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:12456-12460.

FIGURES

FIGURE 1

A)



B)

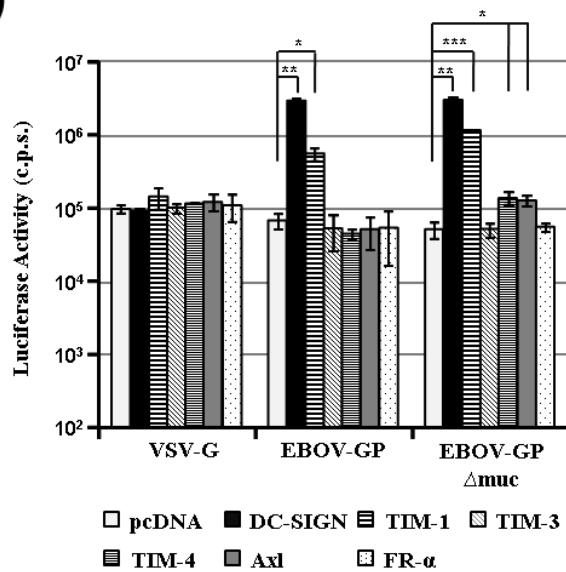


FIG. 1. Directed expression of lectins and TIM-1 augments ebolavirus glycoprotein-mediated transduction. (A) 293T cells transfected to express the indicated lectins or transfected with empty plasmid (pcDNA) were transduced with infectivity-normalized lentiviral pseudotypes bearing the indicated viral glycoproteins. Pseudotypes without glycoprotein served as control. At 72 h post transduction, luciferase activities were determined in cell lysates. The results of a single,

representative experiment performed with triplicate samples are shown. Error bars indicate standard deviation (SD). Similar results were obtained in seven independent experiments using different pseudotype preparations. (B) 293T cells were transfected with plasmids encoding the indicated proteins and transduced as described for (A). The results of a single, representative experiment are shown. Error bars indicate SD. Comparable results were obtained in five additional experiments. Statistical significance was calculated using two-tailed student's t-test.

FIGURE 2

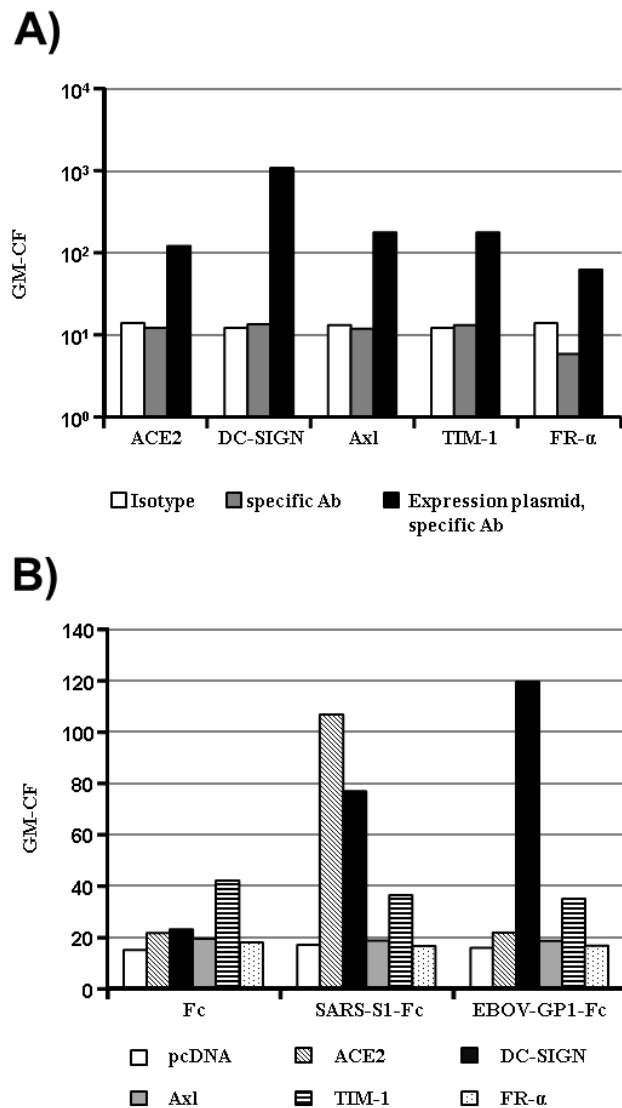


FIG. 2. The surface unit GP1 of the ebolavirus glycoprotein binds to DC-SIGN but not TIM-1 or Axl. (A) 293T cells were transfected with plasmids encoding the indicated proteins or transfected with empty plasmid and then analysed for surface expression of the respective proteins by FACS. An isotype matched control antibody was included as negative control. The geometric mean channel fluorescence (GM-CF) measured in a single, representative experiment carried out with unicates are shown. Similar results were obtained in three separate experiments. (B) Cells analyzed in panel (A) were incubated with the indicated soluble, Fc-tagged

glycoproteins and binding efficiency was determined by FACS. The results of a single, representative experiment carried out with single samples are shown. Similar results were obtained in a separate experiment, performed with a different glycoprotein preparation.

FIGURE 3

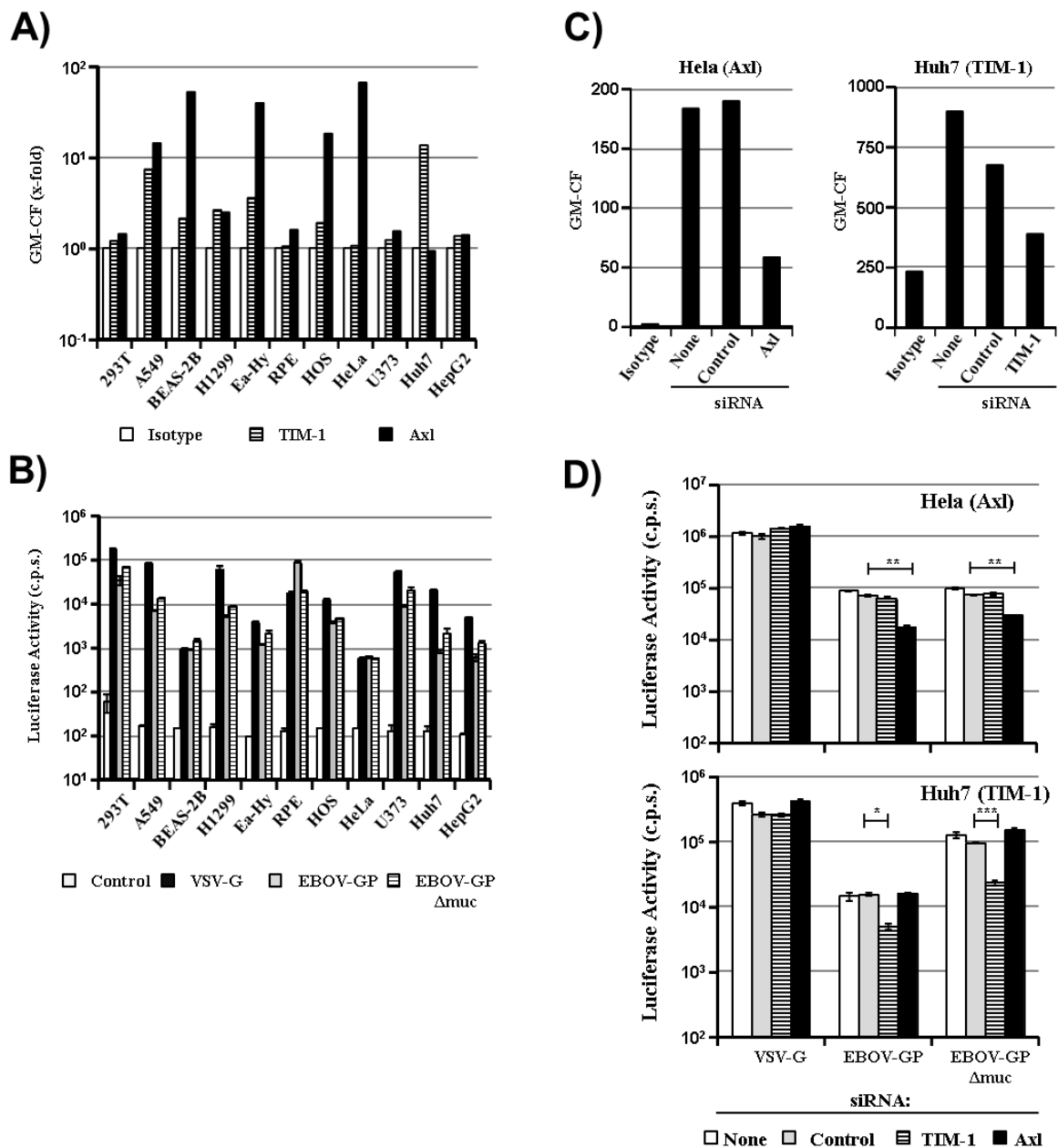


FIG. 3. Enhancement of ebolavirus glycoprotein-mediated infection by endogenous TIM-1 and Axl is cell type-dependent. (A) The indicated cell lines were analyzed for endogenous surface expression of TIM-1 and Axl, respectively. For each individual cell line, the geometric mean channel fluorescence (GMCF) measured with specific antibody is shown relative to GMCF measured upon staining

with an isotype-matched control antibody, which was set as 1. The results of a single, representative experiment are shown and were confirmed in a separate experiment. (B) The panel of cell lines analyzed in (A) was transduced with pseudotypes bearing VSV-G, EBOV-GP or EBOV-GP lacking the mucin domain (EBOV-GP Δ muc). Pseudotypes bearing no glycoprotein were used as a negative control. Luciferase activities in cell lysates were determined at 72 h post transduction. The results of a single, representative experiment performed with triplicate samples are shown. Error bars indicate SD. Comparable results were obtained in at least one independent experiment. (C) HeLa cells, which express endogenous Axl, and Huh-7 cells, which express endogenous TIM-1, were transfected with the indicated siRNAs. Expression of Axl on HeLa cells and expression of TIM-1 on Huh7 cells was determined by FACS at 24 h post transfection. Staining of untransfected cells with isotype-matched control antibody (isotype) served as negative control. The results of a single, representative experiment are shown. Error bars indicate SD. Similar results were obtained in a separate experiment. (D) Cells transfected as described in panel C were transduced with the indicated pseudotypes. At 72 h post transduction, cells were lysed and luciferase activities in cell lysates determined. The results of a single, representative experiment carried out with triplicate samples are shown. Error bars indicate SD. Two additional experiments yielded similar results. Statistical significance was calculated using two-tailed student's t-test.

FIGURE 4

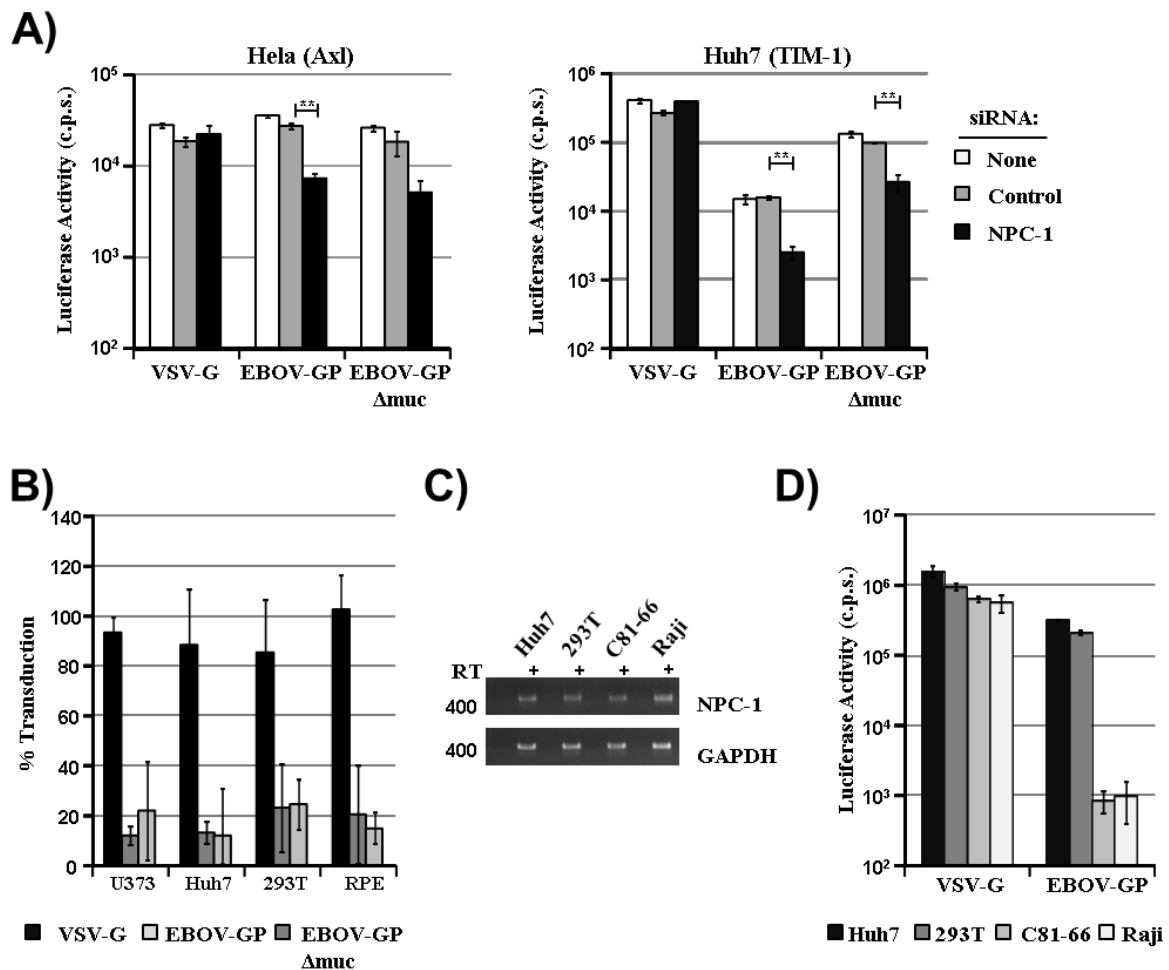


FIG. 4. Expression of endogenous NPC1 promotes ebolavirus glycoprotein-driven entry in a cell-line independent fashion. (A) HeLa and Huh7 cells were transfected the indicated siRNAs and then transduced with the indicated pseudotypes. At 72 h post transduction cells were lysed and analyzed for luciferase activity. The results of a single, representative experiment carried out with triplicate samples are shown. Error bars represent standard deviation (SD). Similar results were obtained in three separate experiments. Statistical significance was calculated using two-tailed student's t-test. (B) The depicted cell lines were incubated with solvent (DMSO) or U18666A at a final concentration of 10 μ M followed by transduction with the indicated pseudotypes as described above. Transduction of

each cell line in the absence of inhibitor was set as 100%. The results of a single, representative experiment are shown. Error bars indicate SD. Similar results were obtained in two separate experiments. (C) Total RNA isolated from Huh7, 293T and the lymphocytic cell lines C81-66 and Raji was analyzed for NPC1 expression by RT-PCR in the presence (+) and absence (-) of reverse transcriptase. Expression of GAPDH was examined as control. (D) The cell lines analyzed in C were transduced with the indicated pseudotypes and analysed for luciferase activity as described above. The results of single, representative experiment carried out with triplicate samples are shown. Error bars indicate SD. The results were confirmed in a separate experiment.

FIGURE 5

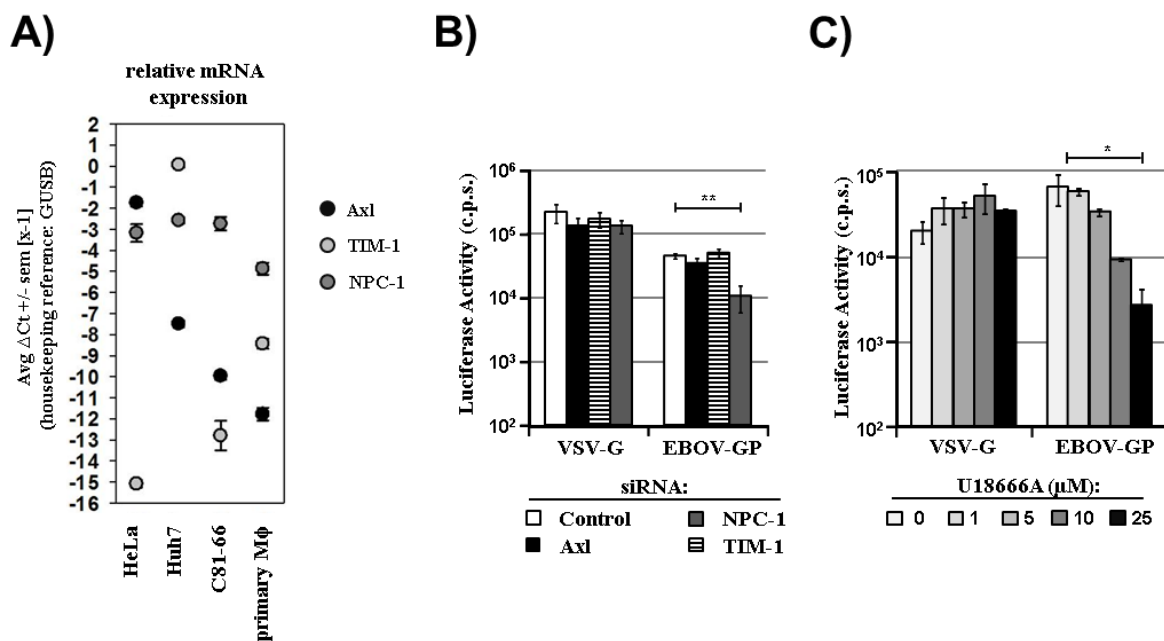


FIG. 5. NPC1 but not Axl or TIM-1 promotes ebolavirus glycoprotein-mediated transduction of macrophages. (A) Total RNA isolated from the indicated cell lines and human monocyte-derived macrophages was treated with DNase and analysed by quantitative RT-PCR for the presence of Axl, TIM-1 and NPC1 transcripts. GUSB served as a housekeeping reference. The results represent the average of three independent analyses, error bars indicate standard deviation (SD). (B) Human monocyte-derived macrophages were transfected with the respective siRNAs and

transduced with the indicated pseudotypes. Luciferase activities in cell lysates were determined at 72 h post transduction. Error bars indicate SD. Comparable results were obtained in eight independent experiments using different pseudotype preparations. Statistical significance was calculated using two-tailed student's t-test. (C) Monocyte-derived macrophages were incubated with the indicated concentrations of U18666A, transduced with the indicated pseudotypes and luciferase activity analysed at 72 h later post transduction. The results of single, representative experiment carried out with triplicate samples are shown. Error bars indicate SD. Two independent experiments yielded similar results. Statistical significance was calculated using two-tailed student's t-test.

FIGURE 6

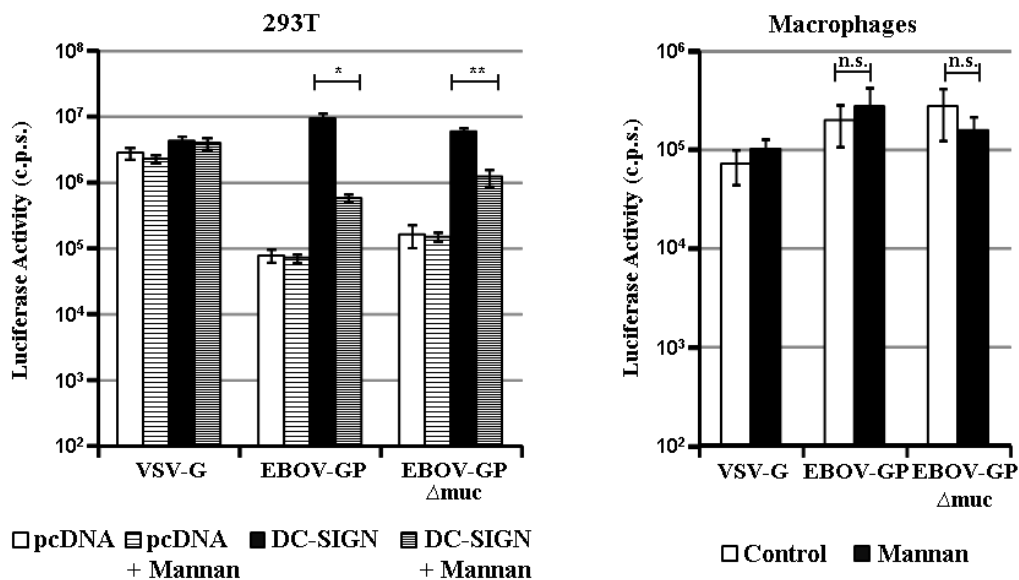


FIG. 6. Mannose-specific lectins do not promote ebolavirus glycoprotein-driven entry into monocyte-derived macrophages. 293T cells. (A) transfected with empty plasmid (pcDNA) or DC-SIGN encoding plasmid as well as monocyte-derived macrophages (B) were incubated with 200 μ g/ml mannan or solvent (control) and then transduced with the indicated pseudotypes. Transduction efficiency was analyzed by quantification of luciferase activities in cell lysates. The results of a representative experiment carried out with triplicate samples are shown. Error bars indicate standard deviation. An independent experiment yielded comparable results.

FIGURE 7

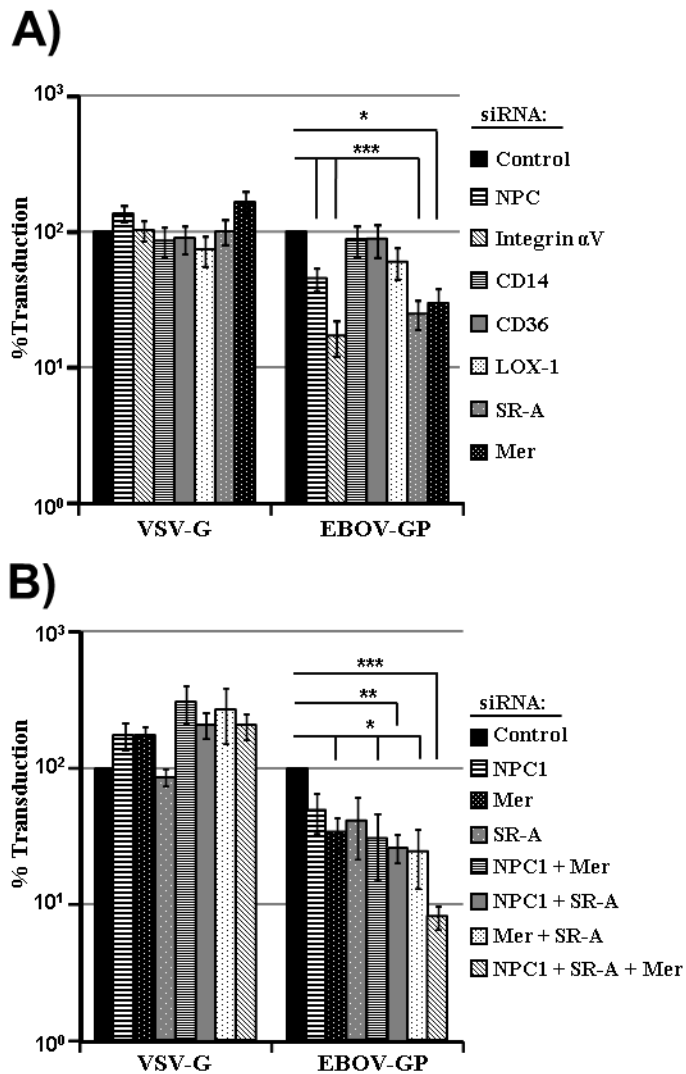


FIG. 7. Transfection of macrophages with siRNAs against NPC1, Mer and SR-A reduces ebolavirus glycoprotein-mediated entry. (A) Monocyte-derived macrophages were transfected with the indicated siRNAs and transduced with the indicated pseudotypes. Luciferase activities in cell lysates were determined at 72 h post transduction. The average of three (Mer), six (SR-A) and up to 15 experiments (NPC1, CD14, CD36, Integrin αV) are shown. Error bars indicate standard error of the mean (SEM). Transduction of cells transfected with control siRNA (control) was set as 100%. (B) The experiment was carried out as described for panel A but combinations of siRNAs were examined. The results shown represent the average of

three independent experiments, error bars indicate SEM.

FIGURE 8

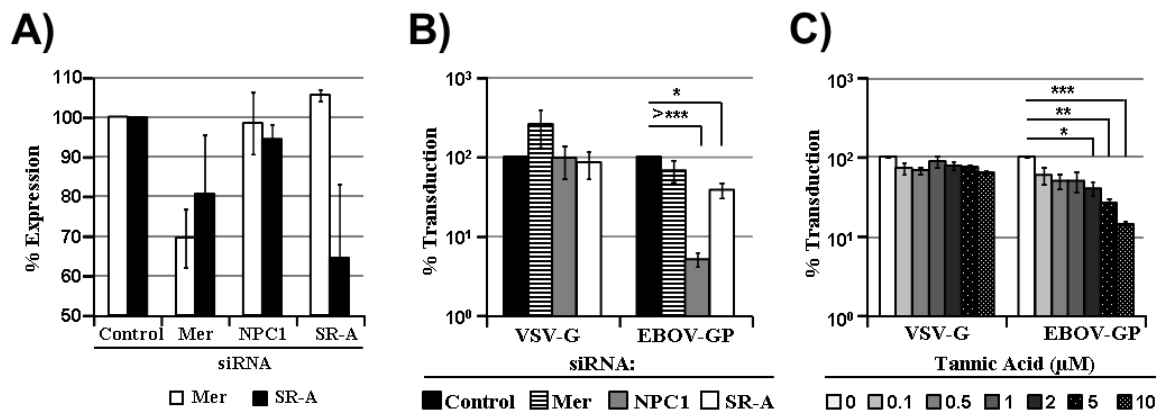


FIG. 8. Specificity of siRNA knock-down of Mer and SR-A expression. (A) THP1 cells induced with PMA were transfected with the indicated siRNA and expression of Mer (white bars) was analyzed via FACS. Monocyte-derived macrophages were transfected with the indicated siRNAs and SR-A expression (black bars) was analyzed by Western blotting. The signals measured were quantified with ImageJ software. Expression of Mer and SR-A in cells transfected with control siRNA was set as 100%. The average of four (Mer expression) to six (SR-A expression) independent experiments are shown. Error bars indicate standard error of the mean (SEM). (B) HeLa cells, which do not express endogenous Mer or SR-A were transfected with the respective siRNAs and transduced with the indicated pseudotypes. Luciferase activities in cell lysates were analysed at 72 h post transduction. The average of four independent experiment performed with triplicate samples is shown. Error bars indicate SEM. The transduction of cells transfected with control siRNA was set as 100%. (C) Monocyte-derived macrophages were incubated the indicated concentrations of tannic acid, transduced with the indicated pseudotypes and transduction efficiency determined as described above. Transduction of cells incubated with solvent (H₂O) was set as 100%. The average of three separate experiments performed with triplicate samples is shown, error bars indicate SEM.

FIGURE 9

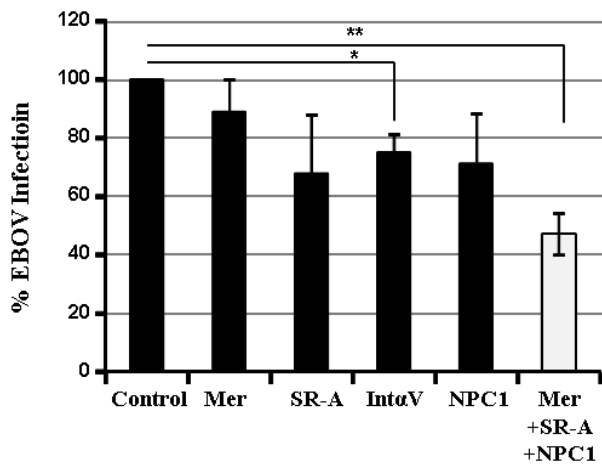


FIG. 9. Transfection of macrophages with siRNAs against NPC1, Mer and SR-A reduces Zaire ebolavirus infection. Monocyte-derived macrophages were transfected with the indicated siRNAs and infected with Zaire ebolavirus strain Mayinga at an MOI of 10. At 16 h post infection, cells were extensively washed, fixed with 4%PFA and stained against for ebolavirus NP and nuclei (DAPI). Staining was analyzed by microscopy and infection efficiency calculated by determining the ratio of NP-positive cells and DAPI-positive cells. The average of four separate experiments carried out with macrophages from different donors is shown. Error bars indicate SEM. Infection of cells transfected with control siRNA was set as 100%.

6 Diskussion

Das Ebolavirus zählt zu den aggressivsten Pathogenen weltweit. Die Sorge vor neuen Ausbrüchen erfordert die Erforschung von neuen antiviralen Strategien, die auf einer genauen Kenntnis der Interaktion der Viren mit ihren Wirtszellen beruhen müssen. Ein potentielles Ziel für die therapeutische Intervention ist der erste Schritt im viralen Vermehrungszyklus, der Viruseintritt in Wirtszellen. Die Aufklärung des viralen Eintritts in Makrophagen ist besonders wichtig, da diese Zellen zu den ersten Zielen zählen, die das Virus infiziert und die auch während der Ausbreitung im Organismus kontinuierlich befallen werden. Welche Wirtszellfaktoren für den Ebolavirus-Eintritt in Makrophagen wichtig sind sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden. Dabei sollte insbesondere die Rolle von Proteinen untersucht werden, die zur Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen beitragen.

6.1 Lektine

Die Lektine DC-SIGN, DC-SIGNR, ASGPR-1, LSECtin und hMGL verstärken den Ebolavirus-Eintritt in Zelllinien (ALVAREZ et al. 2002, BECKER et al. 1995, GRAMBERG et al. 2005, TAKADA 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse für DC-SIGN, DC-SIGNR, ASPGR1 und LSECtin bestätigt werden und es konnte demonstriert werden, dass diese Lektine die EBOV-GP-getriebene Infektion von Zelllinien deutlich effizienter verstärken als andere zelluläre Faktoren, denen eine Rolle im viralen Eintritt zugesprochen wurde. Im Gegensatz dazu wurde der GP-vermittelte Eintritt durch die gerichtete Expression von CLEC5A, dem Mannoserezeptor (MR) und hMGL (siehe Anhang: Abbildung S1A, S1B) nicht verstärkt. CLEC5A und hMGL wurden nicht auf ihre Expression untersucht, daher ist es möglich, dass diese Rezeptoren nicht exprimiert wurden oder nicht funktional sind. Der Mannoserezeptor wurde exprimiert, konnte aber weder den Eintritt von GP-tragenden Vektoren verstärken, noch hatte die Inkubation mit dem Mannosepolymer Mannan einen Effekt auf die Transduktion Mannoserezeptor-exprimierender Zellen. Obwohl der Mannoserezeptor ebenso wie beispielsweise DC-SIGN Mannosereste erkennt, scheint er dennoch ein abweichendes Ligandenspektrum zu haben. Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer Studie gemacht, die Anheftungsstellen für N-

Glykane in EBOV-GP1 mutierte (LENNEMANN et al. 2014): Eine Mutation beeinflusste die DC-SIGN- jedoch nicht die DC-SIGNR-abhängige Verstärkung des GP-vermittelten Zelleintritts, obwohl beide Lektine Mannosereste binden. Diese unterschiedliche Empfänglichkeit wurde auf ein divergierendes Ligandenspektrum zurückgeführt (LENNEMANN et al. 2014). Dieses abweichende Ligandenspektrum kann auch ursächlich für eine nicht vorhandene Steigerung des Eintritts von EBOV-GP-tragenden Vektoren durch CLEC5A und hMGL sein.

Die Bedeutung von Mannose-spezifischen Lektinen für den EBOV-GP-getriebenen Eintritt in Makrophagen wurde durch Inhibitionsstudien mit Mannan untersucht. Mannan ist ein lineares Mannose-Polymer, das die Ligandenbindung an Mannose-spezifische Lektine inhibiert (GEIJTENBEEK et al. 2000, MITCHELL et al. 2001). Die Inkubation von Makrophagen mit Mannan hatte keinen Einfluss auf den GP-getriebenen Eintritt. Was bedeutet dieses Ergebnis für die Rolle von Lektinen in der Ebolavirus-Infektion von Makrophagen?

DC-SIGN ist nicht ubiquitär auf Makrophagen vorhanden, sondern wird auf Monozyten-abgeleiteten Makrophagen nur nach Stimulation mit IL-13 exprimiert (SOILLEUX et al. 2002), das als Stimulanz zur Differenzierung von residierenden in alternativ aktivierte Makrophagen wirkt (SIEWEKE u. ALLEN 2013). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sich Monozyten in Zellkultur auf unterschiedliche Art in Makrophagen differenzieren lassen. Monozyten reifen zu Makrophagen durch die Kultivierung in humanem Serum (DAVIES u. GORDON 2005), dessen Zusammensetzung Spender-abhängig variiert und zur Entstehung einer Mischkultur von Makrophagen beiträgt. Auch die Heterogenität der Monozyten trägt dazu bei (GORDON u. TAYLOR 2005). Weniger heterogene Kulturen werden *in vitro* generiert, indem die Differenzierung in Anwesenheit von Serum durch die Zugabe bestimmter Faktoren gelenkt wird. So entstehen durch Zugabe von IFN- γ und LPS bzw. IL-13 und IL-4 jeweils klassische und alternativ aktivierte Makrophagen (GORDON u. TAYLOR 2005). Im Rahmen der Präparation können Verunreinigungen mit Lymphozyten (und Thrombozyten) auftreten (ZHOU et al. 2012), die diese Faktoren ausschütten und so zur Aktivierung der Makrophagen führen (LOPEZ et al. 1993). Ein Beitrag von DC-SIGN zum GP-vermittelten Eintritt in Makrophagen, die

durch Inkubation von Monozyten mit humanem Serum gewonnen wurden, war daher nicht zu erwarten. Weitere Untersuchungen mit alternativ aktivierten Makrophagen wären an dieser Stelle wünschenswert.

LSECTin wird auf alternativ aktivierten Makrophagen, nicht aber auf primären Monozyten und davon abgeleiteten Makrophagen sowie klassisch aktivierten Makrophagen exprimiert (DOMINGUEZ-SOTO et al. 2007). Die Bindung von EBOV-GP tragenden Vektoren an LSECTin, exprimiert auf induzierbaren 293 Zellen, wird weder von Mannan noch durch das Glucosederivat Acetylglucosamin oder andere Zuckermoleküle gehemmt (GRAMBERG et al. 2005). Der Beitrag von LSECTin zum EBOV-GP-vermittelten Eintritt in Makrophagen kann daher durch Inhibitionsexperimente mit Mannan und Makrophagen, die von Monozyten abgeleitet wurden (MDM) nicht definiert werden.

hMGL wird lediglich während des Reifungsprozesses primärer Makrophagen, nicht aber auf differenzierten Makrophagen exprimiert (HIGASHI et al. 2002b). Außerdem wird die Bindung von Liganden an hMGL durch Acetylgalactosamin aber nicht durch Mannose gehemmt. Infolge fehlender Expression hat hMGL keine Relevanz für den GP-vermittelten Eintritt in Makrophagen. Schließlich ist anzumerken, dass das lösliche Lektin MBL in menschlichem Serum enthalten ist und den Ebolavirus-GP-vermittelten Eintritt unter Komplement-armen Bedingungen verstärken kann (BRUDNER et al. 2013). Der mögliche Beitrag von MBL zum GP-getriebenen Eintritt in Makrophagen wurde nicht untersucht. Ein möglicher infektionsverstärkender Effekt von MBL hätte jedoch durch Mannan unterbunden werden müssen und entsprechende Effekte wurden nicht beobachtet. Es ist daher wahrscheinlich, dass MBL bei der GP-getriebenen Infektion von Makrophagen keine Rolle spielt.

Insgesamt konnte reproduziert werden, dass die Lektine DC-SIGN, DC-SIGNR, LSECTin und ASGPR-1 bei transienter Expression den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren verbessern. Allerdings konnte kein Hinweis darauf erbracht werden, dass diese oder andere Mannose-bindende Lektine den GP-getriebenen Eintritt in die hier analysierten Makrophagen verstärken. Dabei muss jedoch herausgestellt werden, dass keines der Lektine, die den EBOV-GP-getriebenen

Eintritt in Zelllinien verstärkt, auf den aus Monozyten abgeleiteten Makrophagen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu werden neben DC-SIGN auch weitere hier untersuchte Lektine auf Gewebemakrophagen exprimiert und könnten daher die Ebolavirus-Infektion dieser Zellen im Wirt fördern. Eine weiterführende Analyse von Lektinen mit Hilfe von Zellkultursystemen müsste einerseits eine definierte Population an Makrophagen, d.h. klassisch oder alternativ aktivierten Makrophagen, beinhalten und sichern, dass entsprechende Lektine auch exprimiert werden. Andererseits könnten Inhibitoren wie N-Acetylglucosamin oder Galactose eingesetzt werden, um einen möglichen Beitrag von Lektinen zu definieren, die nicht an Mannose binden (POWLESLAND et al. 2008).

6.2 TIM-1

KONDRATOWICZ et al. (2011) zeigten erstmals, dass der PtdSer-Rezeptor TIM-1 den Ebolavirus Eintritt in Zielzellen verstärken kann. Verantwortlich für einen verbesserten Eintritt scheint die Bindung von TIM-1 an PtdSer in der viralen Hüllmembran zu sein (JEMIELITY et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine transiente Expression von TIM-1 den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren in Zielzellen erhöht, übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Daten (KONDRATOWICZ et al. 2011, JEMIELITY et al. 2013). Für TIM-3 konnte keine Erhöhung festgestellt werden, eine Beobachtung die ebenfalls mit publizierten Daten übereinstimmt (KONDRATOWICZ et al. 2011). TIM-3 bindet wie TIM-1 und TIM-4 an PtdSer und es ist daher unklar, warum lediglich TIM-1 und TIM-4 aber nicht TIM-3 den GP-getriebenen Eintritt verstärken. Mögliche Ursachen könnten eine geringere Affinität zu PtdSer (NAKAYAMA et al. 2009) und eine räumliche Ausrichtung der PtdSer-bindenden Domäne sein, die nicht mit der Erkennung von PtdSer in der viralen Hülle kompatibel ist. Im Gegensatz zur publizierten Verstärkung des Wildtyp (Wt) GP-getriebenen Zelleintritts durch TIM-4 (JEMIELITY et al. 2013, MOLLER-TANK et al. 2013) konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich eine moderate Verstärkung der Transduktion durch Vektoren gemessen werden, die EBOV-GP ohne Muzin-ähnliche Domäne in ihrer Hülle tragen. Als Ursache hierfür könnte eine verringerte Expression von TIM-4 in den hier

verwendeten Zellen im Vergleich zu den publizierten Zellsystemen infrage kommen. Allerdings es ist es auch möglich, dass TIM-4-Expression einen toxischen Effekt auf die Zellen hatte und dadurch weniger Zellen transduziert werden konnten. KONDRATOWICZ et al. (2011) zeigten eine direkte Bindung von TIM-1 und GP, was in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnte. In dieser Publikation wurde die Bindung von membranständigem EBOV-GP an lösliches TIM-1 gezeigt, zusätzlich wurden EBOV-GP-tragende Vektoren mit löslichem TIM-1 immunopräzipitiert (KONDRATOWICZ et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit keine Bindung von TIM-1 an GP gemessen werden, das mit dem Fc-Fragment von humanem IgG fusioniert wurde. Diese Beobachtung könnte auf eine unterschiedlich effiziente Bindung von TIM-1 an trimeres, membranassoziertes GP relativ zu dimerem GP-Fc zurückzuführen sein.

TIM-1 ist nur auf einem begrenzten Zellspektrum vorhanden, die Rekrutierung von TIM-1 als Anheftungsfaktor für Ebolaviren ist daher zelltypabhängig. In der vorliegenden Arbeit konnte dies mit Hilfe von siRNA-Experimenten bestätigt werden. Auf Makrophagen wird TIM-1 nicht exprimiert und siRNAs gegen TIM-1 hatten dementsprechend keinen Einfluss auf den GP-getriebenen Eintritt. TIM-3 und TIM-4 wurden nicht untersucht, da sie den Wt GP-getriebenen Eintritt in Zellen nicht verstärkten. Den Einfluss von TIM-4 auf die GP-getriebene Transduktion von Makrophagen könnte nach Deletion der Muzin-ähnlichen Domäne untersucht werden. Allerdings wird TIM-4 nur auf Untergruppen von Makrophagen exprimiert, weswegen vorher die TIM-4-Expression in den zu untersuchenden Makrophagenpräparationen sichergestellt werden müsste.

6.3 TAM Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die TAM Rezeptor-Tyrosinkinasen Tyro3, Axl und Mer (TAM-Rezeptoren) erkennen über die Brückenproteine Gas6 und Protein S PtdSer und sind an der Phagozytose von apoptotischen Zellen beteiligt. Eine Rolle von TAM-Rezeptoren im Ebolavirus Eintritt in Zielzellen konnte durch SHIMOJIMA et al. (2006) demonstriert werden und nachfolgende Arbeiten bestätigten, dass die Verstärkung des GP-getriebenen Eintritts durch TAM-Rezeptoren auf die Bindung von PtdSer in der viralen Hülle via

Gas6 und Protein S zurückzuführen ist (BRINDLEY et al. 2011). TAM-Rezeptoren scheinen daher den GP-getriebenen Eintritt auf die gleiche Weise zu verstärken wie TIM-Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Verstärkung des Eintritts von EBOV-GP-tragenden Vektoren durch transiente Expression von TAM-Rezeptoren beobachtet und es wurde keine Bindung von GP an Axl gemessen. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die siRNA-vermittelte Verringerung der Axl-Expression in bestimmten Zelllinien den GP-getriebenen Eintritt vermindert. Die fehlende Bindung von GP an Axl steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Axl den GP-vermittelten Eintritt über die Gas6/Protein S-vermittelte Interaktion mit PdtSer in der viralen Hülle verstärkt. Eine fehlende Verstärkung der GP-getriebenen Transduktion von 293T Zellen nach gerichteter Expression von Axl ist nicht unerwartet, da diese Zellen für den GP-getriebenen Eintritt sehr empfänglich sind und moderate, verstärkende Effekte von Axl vermutlich durch die Wirkung anderer Eintrittsfaktoren überdeckt wird. Die Beobachtung, dass die Verminderung der endogenen Expression von Axl den GP-vermittelten Eintritt nur in einer Untermenge der Axl-positiven Zelllinien verstärkt, könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass Axl, Tyro3 und Mer parallel auf bestimmten Zelllinien und primären Zellen exprimiert werden (beispielsweise in Sertolizellen (LU et al. 1999), Purkinje Zellen von Ratten (PRIETO et al. 2000), murinen Peritonealmakrophagen (SEITZ et al. 2007), Thrombozyten (ANGELILLO-SCHERRER et al. 2001)). So könnte bei reduzierter Expression von Axl ein anderer TAM-Rezeptor die Transduktion durch EBOV-GP-tragende Vektoren fördern. Die anschließende Internalisierung würde dann durch Makropinozytose erfolgen, ein Prozess der mit der Expression von Axl und PI3K in Verbindung steht (SHANKAR et al. 2003, SHANKAR et al. 2006, ANGELILLO-SCHERRER et al. 2005). Um eine Rolle für den GP-vermittelten Eintritt genauer zu untersuchen, müsste ein *knockdown* aller TAM-Rezeptoren mit anschließender Infektion erfolgen. Alternativ könnten lösliche TAM-Rezeptoren simultan vor der Infektion eingesetzt werden um vorhandenes Gas6/ Protein S zu binden. Werden Ebolaviren dann immer noch effektiv aufgenommen, könnte dies an einem unbekanntem Rezeptor liegen, der in der Lage ist, Makropinozytose zu stimulieren. Bisher ist darüber nichts bekannt und es wird davon ausgegangen, dass Makropinozytose nicht Rezeptor-vermittelt

induziert wird. Wäre dies aber der Fall, hätten TAM-Rezeptoren eine unterstützende, aber keine essentielle Funktion für die Aufnahme von Ebolaviren in die Zielzellen.

Auf klassischen Phagozyten dienen die TAM-Rezeptoren der Erkennung und Entfernung apoptotischer Zellen. Mer wurde bisher die geringste Bedeutung als Rezeptorkandidat für Ebolavirus zugesprochen (SHIMOJIMA et al. 2006), was darauf zurückzuführen sein könnte, dass Mer von allen TAM-Rezeptoren die geringste Affinität zu Gas6 aufweist (NAGATA et al. 1996). Im Gegensatz dazu scheint Mer der wichtigste TAM-Rezeptor auf Makrophagen in Bezug auf die Entfernung apoptotischer Zellen zu sein (SCOTT et al. 2001, SEITZ et al. 2007). Interessanterweise scheint insbesondere die Internalisierung apoptotischer Zellen durch Mer gefördert zu werden (SCOTT et al. 2001, LINGER et al. 2008). Die Internalisierung wird ermöglicht, indem Mer nach Bindung an PtdSer Signalkaskaden induziert, die zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts führen, möglicherweise über die Interaktion mit dem Integrin $\alpha_v\beta_5$ (WU et al. 2005). Diese Bindung kann aber nicht allein auf Mer zurückgeführt werden, da auch Mer *knockout*-Mäuse in der Lage sind, apoptotische Körper zu binden (SCOTT et al. 2001). In einem Bindungsassay konnten wir zeigen, dass Mer nicht in der Lage ist, GP-Fc zu binden (siehe Anhang: Abbildung S2). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Virusmembran-assoziiertes PtdSer im Versuch nicht vorhanden war und damit eine direkte Interaktion zwischen dimerem GP und Mer ausgeschlossen werden kann, ähnlich wie es für Axl bereits gezeigt wurde (BRINDLEY et al. 2011).

Der siRNA *knockdown* der Mer-Expression verminderte die GP-vermittelte Transduktion von Makrophagen deutlich. Im Gegensatz dazu wurde die Ebolavirus-Infektion von Makrophagen durch Mer-spezifische siRNA kaum inhibiert. Wie kann man den massiven Effekt des *knockouts* von Mer auf EBOV-GP-tragende Vektoren im Vergleich zu replikationsfähigem Virus erklären? MORIZONO et al. (2011) zeigten anhand eines Sindbisvirus-GP-tragenden Vektors, dass die Gas6 vermittelte Aufnahme abhängig ist von der Infektiosität – je weniger infektiös die Vektorpräparation für Rezeptor-negative Zellen ist, desto mehr wird die Gas6/Protein S-abhängige Infektion von TAM-Rezeptoren Zellen verstärkt. Es ist daher möglich, dass die hocheffiziente Infektion von Makrophagen (MOI 10, gemessen mit Vero

Zellen) die Mer-vermittelte Steigerung der Infektion überdeckt hat. Alternativ dazu ist es denkbar, dass weniger PtdSer in der Ebolavirus-Hüllmembran im Vergleich zur Hüllmembran von lentiviralen Vektoren enthalten ist.

6.4 Integrine

Die Interaktion zwischen Ebolavirus mit Integrinen, insbesondere β_1 Integrinen, wurde erstmals durch TAKADA et al. (2000) beschrieben. Dabei wurde auch ein geringgradiger Effekt von Integrin $\alpha_V\beta_3$ auf den Eintritt von EBOV-GP-tragenden Vektoren von 293T Zellen festgestellt (TAKADA et al. 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Integrin α_V -*knockdown* in Makrophagen die Transduktion mit EBOV-GP-tragenden Vektoren und die Infektion mit replikationsfähigem EBOV deutlich reduziert. Es ist denkbar, dass dieser Effekt auf den Einfluss von Integrinen auf die Cathepsin-Expression zurückzuführen ist. So zeigten SCHORNBERG et al. (2009), dass in Zellen mit verminderter Integrin $\alpha_5\beta_1$ Expression die Expression der Doppelkette von Cathepsin L reduziert und dadurch die Cathepsin L-Aktivität zu 90% vermindert ist, Cathepsin B dagegen unbeeinflusst bleibt. Die ebenfalls reduzierte Transduktion dieser Zellen konnte durch Integrin α_4 Expression teilweise wieder aufgehoben werden. Dies spricht für eine nicht nur auf Integrin $\alpha_5\beta_1$ beschränkte Interaktion mit Cathepsinen.

Alternativ könnte die verstärkende Wirkung von Integrinen auf den GP-vermittelten Eintritt auf eine direkte Bindung an GP und eine daraus folgende verstärkte Anheftung von Viren an Zielzellen zurückzuführen sein. Schließlich ist es denkbar, dass Integrine den viralen Eintritt auf die gleiche Weise verstärken wie TIM-Proteine und TAM-Rezeptor-Tyrosinkinase: Die Versuche zur Rolle von Integrinen im GP-vermittelten Eintritt wurden in Anwesenheit von fetalem Kälberserum (FKS) durchgeführt, das MFG-E8 enthält (BUTLER et al. 1980). MFG-E8 ist ein Brückenprotein, das durch aktivierte Makrophagen ausgeschüttet wird (JINUSHI et al. 2007, HANAYAMA et al. 2002) und sowohl an PtdSer als auch an Integrin $\alpha_V\beta_3$ bindet (HANAYAMA et al. 2002). Bovines MFG-E8 in FKS-haltigen Pseudotypenpräparation und Zellkulturmedien könnte daher ebenso wie humanes MFG-E8 mit humanen Integrinen interagieren (ANDERSEN et al. 2000).

Entsprechend ist es möglich, dass MFG-E8 die Bindung GP-tragender Vektoren/ EBOV an Zellen vermittelt hat. Um eine mögliche direkte Bindung zwischen EBOV-GP-tragenden Vektoren/ EBOV und Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu zeigen, müsste ein Bindungsassay in Abwesenheit von Serum durchgeführt werden. Daneben müsste beispielsweise durch siRNA *knockdown* die Sekretion von MFG-E8 durch Makrophagen unterdrückt werden. Schließlich muss angemerkt werden, dass die siRNA gegen Integrin α_v nicht auf Spezifität untersucht wurde. Deutliche unspezifische Effekte sind jedoch weitestgehend auszuschließen, da der Eintritt von VSV-G-tragenden Vektoren nicht durch die Integrin α_v spezifische siRNA beeinträchtigt wurde.

6.5 Makropinozytose

Die Internalisierung über Makropinozytose bzw. einen Makropinozytose-ähnlichen Weg ist weitgehend für Ebolavirus anerkannt (NANBO et al. 2010, SAEED et al. 2010, ALEKSANDROWICZ et al. 2011, MULHERKAR et al. 2011). Nachdem auch der Dynamin-Inhibitor Dynasore den viralen Eintritt in primäre Makrophagen hemmte, schlugen MULHERKAR et al. (2011) einen Makropinozytose-ähnlichen Eintrittsmechanismus vor. Im Zusammenhang mit Makropinozytose beschränkten sich daher die hier durchgeführten Arbeiten auf einen Test des PI3K-Inhibitors Wortmannin, der Makropinozytose inhibiert. Die Behandlung von Makrophagen mit Wortmannin führte zu einer dosisabhängigen Inhibition des Eintritts von EBOV-GP-tragenden Vektoren (siehe Anhang: Abbildung S3). Eine Rolle des TAM-Rezeptors Axl in der Makropinozytose wurde bereits beschrieben (HUNT et al. 2011). Die PI3K ist interessanterweise nicht nur wichtig im Rahmen der Makropinozytose, sondern spielt auch eine Rolle in der Phagozytose (MERCER et al. 2010). Möglicherweise trägt Phagozytose, die für die Entfernung apoptotischen Materials durch spezialisierte Zellen herangezogen wird, auch zur Aufnahme von GP-tragenden Vektoren bei. DECATHELINEAU u. HENSON (2003) schlagen vor, dass Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose apoptotischer Zellen abzugrenzen ist von dem Phagozytose-ähnlichen Vorgang, der durch Integrine, TAM-Rezeptoren und *scavenger* Rezeptoren vermittelt wird. Eine Abgrenzung ist insofern auch

erforderlich, als dass auch nicht-klassische Phagozyten, wie Epithelzellen in der Lage sind, apoptotisches Material zu internalisieren (VANDIVIER et al. 2006). Sie bezeichnen diesen Phagozytose-ähnlichen Vorgang als „Efferocytosis“ (*effere* lat. „zu Grabe tragen“). „Efferocytosis“ wird ebenfalls als Makropinozytose-ähnlicher Vorgang beschrieben und ist ebenso abhängig vom Na^+/H^+ -Austausch (VANDIVIER et al. 2006). Möglicherweise stimmen die „Efferocytosis“ und die für das Ebolavirus beschriebene Makropinozytose-ähnliche Internalisierung überein. Dafür spricht auch, dass die Phagozytose im Gegensatz zur Makropinozytose ein Dynamin-abhängiger Vorgang ist (MERCER et al. 2010), was MULHERKAR et al. (2011) für Ebolavirus bestätigen konnten. Um die Makropinozytose definitiv für den Eintritt in Makrophagen zu bestätigen, müssten natürlich alle spezifischen Schritte der Makropinozytose (MERCER u. HELENIUS 2009) in diesem System untersucht werden. Die Übereinstimmung des Ebolavirus-Eintritts mit der Aufnahme via „Efferocytosis“ ist schwieriger nachzuvollziehen. Zur Untersuchung müssten der Einfluss von Ebolavirus auf die Signalkaskaden der „Efferocytosis“ (siehe auch KORNS et al. (2011)) analysiert werden.

6.6 NPC1

Neben dem Einfluss der beschriebenen Oberflächenmoleküle auf den Eintritt von Ebolaviren konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine Abhängigkeit von dem intrazellulären Rezeptor NPC1 festgestellt werden, in Einklang mit bereits veröffentlichten Daten (CARETTE et al. 2011, COTE et al. 2011, MILLER et al. 2012a). NPC1 wird ubiquitär exprimiert, dies gilt nach qRT-PCR-Analysen auch für primäre Makrophagen und getestete Lymphozytenzelllinien. Die Rolle von NPC1 im Ebolavirus-Eintritt in Zellen konnte erstmals mit Hilfe von Fibroblasten aus Niemann-Pick C1-Patienten gezeigt werden, die deutlich verminderte virale Replikation im Vergleich zu Wt Fibroblasten aufwiesen (CARETTE et al. 2011). Außerdem konnte demonstriert werden, dass eine Reptilienzelllinie nach Expression von NPC1 durch das Ebolavirus infizierbar wird (MILLER et al. 2012a). Allerdings wird NPC1 auch in Lymphozyten, die sich nicht mit GP-tragenden Vektoren transduzieren lassen, exprimiert. Daher kann NPC1 allein nicht für den GP-vermittelten Eintritt

verantwortlich gemacht werden. Der fehlende Eintritt in Lymphozyten ist möglicherweise auf das Fehlen eines unbekanntes Oberflächenmoleküls zurückzuführen. Die Expression von NPC1 in Makrophagen war sowohl für die Transduktion mit EBOV-GP-tragenden Vektoren als auch für die Infektion mit replikationsfähigem EBOV (Stamm Mayinga) wichtig. Die Infektion konnte nicht vollständig verhindert werden, was mit einem unvollständigen *knockdown* zusammenhängen kann. Dieser lag bei den auf Spezifität getesteten siRNAs bei einer 30-40% Herunterregulation der Rezeptoren (siehe auch Anhang: Abbildung S4). Der Einsatz des Inhibitors U18666A verursachte eine Dosis-abhängige Reduktion der Transduktion von primären Makrophagen. Es handelt sich hierbei nicht um einen Inhibitor, der die direkte Bindung von NPC1 an EBOV-GP verhindert und der genaue Mechanismus der Inhibition ist unklar (SHOEMAKER et al. 2013). So könnte U18666A auch mit anderen Molekülen interagieren, die für den Ebolavirus-Eintritt von Bedeutung sind, wie beispielsweise der ASMase (SHOEMAKER et al. 2013).

6.7 SR-A

Apoptotische Körper werden durch Phagozytose infolge der Erkennung so genannter „eat-me“-Signale von klassischen Phagozyten internalisiert. Zu diesen „eat-me“-Signalen zählt PtdSer, dessen Erkennung durch Moleküle wie TIM-4, Mer oder Integrin $\alpha_V\beta_3$ vermittelt wird. PtdSer scheint aber nicht als Signal auszureichen, um Phagozytose apoptotischer Körper zu induzieren (RAVICHANDRAN 2011).

Auch SR-A ist in die Aufnahme apoptotischer Zellen involviert, daneben werden modifiziertes LDL und polyanionische Liganden gebunden. Dies konnte anhand von reduzierter Phagozytose apoptotischer Thymozyten in *knockout*-Mausmakrophagen gezeigt werden (PLATT et al. 1996). Allerdings war diese Beobachtung *in vivo* nicht reproduzierbar (PLATT et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass siRNA *knockdown* von SR-A den EBOV-GP vermittelten Eintritt in Makrophagen und die Infektion dieser Zellen mit replikationsfähigem Ebolavirus reduziert. Auch die Inkubation der Zellen mit den SR-A Liganden *tannic acid* und Fucoidan (BROWN u. GOLDSTEIN 1983)(siehe Anhang: Abbildung S5B) reduzierte

den GP-vermittelten Eintritt. Allerdings konnte weder eine direkte Bindung von EBOV-GP an verschiedene SR-A-Isotypen festgestellt werden, noch erhöhte die transiente Expression von SR-A den Eintritt (siehe Anhang: Abbildung S2 und S5). Auch der Eintritt in SR-A *knockout*-Mausmakrophagen war im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle unverändert (siehe Anhang: Abbildung S6). Diese Ergebnisse zeigen, dass SR-A keinen Bindungspartner für das Ebolavirus Glykoprotein darstellt, aber dennoch Einfluss auf den GP-vermittelten Eintritt hat.

BRUDNER et al. (2013) ermittelten keinen Einfluss von SR-A shRNA auf den GP-vermittelten Eintritt, allerdings ohne die SR-A Expression durch 293F Zellen zu testen. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir siRNA, die nicht spezifisch gegen eine der SR-A Isoformen gerichtet ist. Demzufolge könnte der *knockdown* einerseits die Expression von SR-A1 und SR-A2 blockieren, andererseits könnte auch die SR-A3 reduziert werden. SR-A3 hat einen dominant-negativen Effekt auf die SR-A1 und SR-A2 Funktion (GOUGH et al. 1998). Um den Beitrag der SR-A Isoformen zum GP-vermittelten Eintritt in Makrophagen abzugrenzen, müssten Isoform-spezifische siRNAs eingesetzt werden. Der eingesetzte Inhibitor *tannic acid* wurde ursprünglich entdeckt, als Moleküle gesucht wurden, die den Antigentransfer von B-Zellen zu Makrophagen über SR-A inhibieren (RAYCROFT et al. 2012). Interessanterweise inhibiert *tannic acid* aber nicht nur die Aufnahme von Antigen, sondern wurde auch berichtet als Inhibitor intrazellulärer Transportprozesse (DI PASQUALE u. CHIORINI 2006, POLISHCHUK et al. 2004). Entsprechend könnte durch *tannic acid* der intrazelluläre Transport von EBOV-GP und nicht die Bindung an die Zelle inhibiert werden. Der ebenfalls eingesetzte SR-A Inhibitor Fucoidan ist ein Fucose-reiches Polysaccharid (ALE et al. 2011), das mit modifiziertem LDL um die Bindung an SR-A konkurriert (BROWN u. GOLDSTEIN 1983). Fucoidan inhibiert verschiedene Viren. So konnte gezeigt werden, dass Fucoidan die reverse Transkriptase von HIV inhibiert (Moen, Clark 1993). Dies könnte erklären, warum auch VSV-G tragende HIV-Vektoren durch höhere Konzentrationen Fucoidan gehemmt wurden (nicht dargestellt).

Warum die SR-A Expression für die effiziente, GP-vermittelte Transduktion von Makrophagen verzichtbar ist, ist gegenwärtig unklar. Der fehlende Einfluss des SR-A

knock-outs auf die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen *in vivo* wurde auf eine Kompensation des Verlusts von SR-A durch andere Rezeptoren zurückgeführt (PLATT et al. 2000). Ähnliches könnte auch für die GP-vermittelte Transduktion von SR-A *knockout* Makrophagen gelten. Alternativ dazu ist es möglich, dass Maus-SR-A aufgrund von Sequenzunterschieden zu humanem SR-A (~73% Identität auf Proteinebene, *Pairwise Alignment Scores, HomoloGene*, NCBI) den GP-vermittelten Eintritt nicht verstärken kann. Schließlich muss angeführt werden, dass die Expression bzw. die fehlende Expression von SR-A auf Mausmakrophagen in der vorliegenden Studie nicht bestätigt wurde. Im Rahmen weiterführender Analysen sollte diese Kontrolle durchgeführt werden.

Die Kombination von siRNAs gegen Mer, SR-A und NPC1 inhibierte den EBOV-GP-getriebenen Eintritt bzw. die EBOV-Infektion von Makrophagen deutlich effizienter als die einzelnen siRNAs allein. TODT et al. (2008) zeigten eine Interaktion zwischen Mer und SR-A und auch eine Interaktion zwischen der PI3K und SR-A wurde beschrieben (CHOLEWA et al. 2010, NIKOLIC et al. 2007). Möglicherweise führt daher der kombinierte *knockdown* der Mer- und SR-A-Expression zu einer verringerten Aktivität der PI3K, was zur Folge hätte, dass weniger Virus internalisiert wird. Ein wichtiger Beitrag von PI3K zur GP-getriebenen Transduktion von Makrophagen konnte durch den Einsatz von Wortmannin bestätigt werden (siehe Anhang: Abbildung S3). Keinen Einfluss auf den EBOV-GP-getriebenen Eintritt bzw. die EBOV-Infektion von Makrophagen hatten dagegen siRNAs gegen andere *scavenger* Rezeptoren wie CD14, CD36 und LOX-1, wobei diese siRNAs nicht auf Funktionalität getestet wurden. Insgesamt ergibt sich, dass SR-A ebenso wie andere *scavenger* Rezeptoren nicht mit dem viralen Glykoprotein interagiert, sondern den Eintritt wahrscheinlich über indirekte Mechanismen verstärkt.

Die bis jetzt verfügbaren Daten deuten darauf hin, dass Ebolaviren apoptotisches Mimikry für die Aufnahme in Makrophagen nutzen. Die Aufnahme apoptotischer Körper ist jedoch nicht auf klassische Phagozyten (wie Makrophagen) begrenzt. Diese stellen zwar die primären Zielzellen für das Ebolavirus dar, machen aber nur einen Teil des gesamten *pools* der infizierbaren Zellen aus. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob die Aufnahme apoptotischer Körper über

„Efferocytosis“, die auch von nicht-klassischen Phagozyten durchgeführt wird (WALSH et al. 1999, VANDIVIER et al. 2006), dem Aufnahmemechanismus von Ebolaviren entspricht.

6.8 Ausblick

Zur weiteren Abklärung des Beitrags von apoptotischem Mimikry zum Eintritt von Ebolaviren in Zielzellen müssen die experimentellen Bedingungen optimiert werden: Um die Bedeutung bestimmter zellulärer Faktoren herauszuarbeiten, müssen Seren und Virus-Präparationen frei von Brückenmolekülen sein, die PtdSer erkennen, und als Kontrolle sollte PtdSer in der Virushülle durch Agenzien wie Annexin V blockiert werden. Außerdem muss auf mechanistischer Ebene besser verstanden werden, wie apoptotisches Mimikry den Eintritt verstärkt. Ein Vergleich von apoptotischen Körpern und Ebolaviren wird dadurch erschwert, dass auch die Mechanismen hinter der Aufnahme apoptotischer Körper nicht vollständig geklärt sind. So kann gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden, dass ein Rezeptor die „Efferocytosis“ induziert. Makrophagen sind die ersten Zellen, die durch Ebolaviren infiziert werden - vielleicht auch einfach auf Grund ihrer Funktion als Phagozyten. Trifft dies auf alle Ebolavirus Spezies und Marburgvirus zu? Tragen die bis dato identifizierten Eintrittsfaktoren auch zur Infektion der Zellen von Flughunden bei – gibt es Parallelen? Sind Makrophagen aus Javaneraffen besser mit Reston ebolavirus infizierbar als humane Makrophagen? Liegt hier die Ursache für die unterschiedliche Pathogenität? Auf diese und weitere Fragen wird hoffentlich die Zukunft eine Antwort finden. Nur so kann es eines Tages gelingen, diese tödliche Krankheit zu besiegen.

7 Literaturverzeichnis

- ALBERT, M. L., S. F. PEARCE, L. M. FRANCISCO, B. SAUTER, P. ROY, R. L. SILVERSTEIN u. N. BHARDWAJ (1998):
Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.
J Exp Med. 188, 1359-1368
- ALE, M. T., J. D. MIKKELSEN u. A. S. MEYER (2011):
Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds.
Mar Drugs. 9, 2106-2130
- ALEKSANDROWICZ, P., A. MARZI, N. BIEDENKOPF, N. BEIMFORDE, S. BECKER, T. HOENEN, H. FELDMANN u. H. J. SCHNITTLER (2011):
Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis.
J Infect Dis. 204 Suppl 3, S957-967
- ALVAREZ, C. P., F. LASALA, J. CARRILLO, O. MUNIZ, A. L. CORBI u. R. DELGADO (2002):
C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans.
J Virol. 76, 6841-6844
- ANDERSEN, M. H., H. GRAVERSEN, S. N. FEDOSOV, T. E. PETERSEN u. J. T. RASMUSSEN (2000):
Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin.
Biochemistry. 39, 6200-6206
- ANDERSON, A. C., D. E. ANDERSON, L. BREGOLI, W. D. HASTINGS, N. KASSAM, C. LEI, R. CHANDWASKAR, J. KARMAN, E. W. SU, M. HIRASHIMA, J. N. BRUCE, L. P. KANE, V. K. KUCHROO u. D. A. HAFLER (2007):
Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells.
Science. 318, 1141-1143

- ANGELILLO-SCHERRER, A., L. BURNIER, N. FLORES, P. SAVI, M. DEMOL, P. SCHAEFFER, J. M. HERBERT, G. LEMKE, S. P. GOFF, G. K. MATSUSHIMA, H. S. EARP, C. VESIN, M. F. HOYLAERTS, S. PLAISANCE, D. COLLEN, E. M. CONWAY, B. WEHRLE-HALLER u. P. CARMELIET (2005):
Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy.
J Clin Invest. 115, 237-246
- ANGELILLO-SCHERRER, A., P. DE FRUTOS, C. APARICIO, E. MELIS, P. SAVI, F. LUPU, J. ARNOUT, M. DEWERCHIN, M. HOYLAERTS, J. HERBERT, D. COLLEN, B. DAHLBACK u. P. CARMELIET (2001):
Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis.
Nat Med. 7, 215-221
- AVOTA, E., E. GULBINS u. S. SCHNEIDER-SCHAULIES (2011):
DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells.
PLoS Pathog. 7, e1001290
- BAKKER, A. B., E. BAKER, G. R. SUTHERLAND, J. H. PHILLIPS u. L. L. LANIER (1999):
Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 9792-9796
- BARRETTE, R. W., S. A. METWALLY, J. M. ROWLAND, L. XU, S. R. ZAKI, S. T. NICHOL, P. E. ROLLIN, J. S. TOWNER, W. J. SHIEH, B. BATTEN, T. K. SEALY, C. CARRILLO, K. E. MORAN, A. J. BRACHT, G. A. MAYR, M. SIRIOS-CRUZ, D. P. CATBAGAN, E. A. LAUTNER, T. G. KSIAZEK, W. R. WHITE u. M. T. MCINTOSH (2009):
Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus.
Science. 325, 204-206
- BASLER, C. F. u. G. K. AMARASINGHE (2009):
Evasion of interferon responses by Ebola and Marburg viruses.
J Interferon Cytokine Res. 29, 511-520

- BASLER, C. F., X. WANG, E. MUHLBERGER, V. VOLCHKOV, J. PARAGAS, H. D. KLENK, A. GARCIA-SASTRE u. P. PALESE (2000):
The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist.
Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 12289-12294
- BAVARI, S. (2002):
Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses.
J Exp Med. 195, 593-602
- BECKER, S., M. SPIESS u. H. D. KLENK (1995):
The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus.
J Gen Virol. 76, 393-399
- BENIAC, D. R., P. L. MELITO, S. L. DEVARENNES, S. L. HIEBERT, M. J. RABB, L. L. LAMBOO, S. M. JONES u. T. F. BOOTH (2012):
The organisation of Ebola virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy.
PLoS One. 7, e29608
- BHARAT, T. A., T. NODA, J. D. RICHES, V. KRAEHLING, L. KOLESNIKOVA, S. BECKER, Y. KAWAOKA u. J. A. BRIGGS (2012):
Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography.
Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 4275-4280
- BHATTACHARYYA, S., K. L. WARFIELD, G. RUTHEL, S. BAVARI, M. J. AMAN u. T. J. HOPE (2010):
Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway.
Virology. 401, 18-28
- BOUKOUR, S., J. M. MASSE, L. BENIT, A. DUBART-KUPPERSCHMITT u. E. M. CRAMER (2006):
Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes.
J Thromb Haemost. 4, 426-435

BOWDISH, D. M. u. S. GORDON (2009):

Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function.

Immunol Rev. 227, 19-31

BOWEN, E. T., G. LLOYD, W. J. HARRIS, G. S. PLATT, A. BASKERVILLE u. E. E. VELLA (1977):

Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent.

Lancet. 1, 571-573

BRAY, M. u. T. W. GEISBERT (2005):

Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever.

Int J Biochem Cell Biol. 37, 1560-1566

BRINDLEY, M. A., C. L. HUNT, A. S. KONDRATOWICZ, J. BOWMAN, P. L. SINN, P. B. MCCRAY, JR., K. QUINN, M. L. WELLER, J. A. CHIORINI u. W. MAURY (2011):

Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein.

Virology. 415, 83-94

BROWN, M. S. u. J. L. GOLDSTEIN (1983):

Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.

Annu Rev Biochem. 52, 223-261

BRUDNER, M., M. KARPEL, C. LEAR, L. CHEN, L. M. YANTOSCA, C. SCULLY, A. SARRAJU, A. SOKOLOVSKA, M. R. ZARIFFARD, D. P. EISEN, B. A. MUNGALL, D. N. KOTTON, A. OMARI, I. C. HUANG, M. FARZAN, K. TAKAHASHI, L. STUART, G. L. STAHL, A. B. EZEKOWITZ, G. T. SPEAR, G. G. OLINGER, E. V. SCHMIDT u. I. C. MICHELOW (2013):

Lectin-dependent enhancement of Ebola virus infection via soluble and transmembrane C-type lectin receptors.

PLoS One. 8, e60838

- BUTLER, J. E., D. J. PRINGNITZ, C. L. MARTENS u. N. CROUCH (1980):
Bovine-associated mucoprotein: I. Distribution among adult and fetal bovine tissues and body fluids.
Differentiation. 17, 31-40
- CANTON, J., D. NECULAI u. S. GRINSTEIN (2013):
Scavenger receptors in homeostasis and immunity.
Nature Reviews Immunology. 13, 621-634
- CARETTE, J. E., M. RAABEN, A. C. WONG, A. S. HERBERT, G. OBERNOSTERER, N. MULHERKAR, A. I. KUEHNE, P. J. KRANZUSCH, A. M. GRIFFIN, G. RUTHEL, P. DAL CIN, J. M. DYE, S. P. WHELAN, K. CHANDRAN u. T. R. BRUMMELKAMP (2011):
Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1.
Nature. 477, 340-343
- CHAN, S. Y., C. J. EMPIG, F. J. WELTE, R. F. SPECK, A. SCHMALJOHN, J. F. KREISBERG u. M. A. GOLDSMITH (2001):
Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses.
Cell. 106, 117-126
- CHANDRAN, K., N. J. SULLIVAN, U. FELBOR, S. P. WHELAN u. J. M. CUNNINGHAM (2005):
Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection.
Science. 308, 1643-1645
- CHEN, S. T., Y. L. LIN, M. T. HUANG, M. F. WU, S. C. CHENG, H. Y. LEI, C. K. LEE, T. W. CHIOU, C. H. WONG u. S. L. HSIEH (2008):
CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease.
Nature. 453, 672-676
- CHEN, S. T., R. S. LIU, M. F. WU, Y. L. LIN, S. Y. CHEN, D. T. TAN, T. Y. CHOU, I. S. TSAI, L. LI u. S. L. HSIEH (2012):
CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality.
PLoS Pathog. 8, e1002655

- CHIRATHAWORN, C., A. PONGPANICH u. Y. POOVORAWAN (2004):
Herpes simplex virus 1 induced LOX-1 expression in an endothelial cell line, ECV 304.
Viral Immunol. 17, 308-314
- CHOLEWA, J., D. NIKOLIC u. S. R. POST (2010):
Regulation of class A scavenger receptor-mediated cell adhesion and surface localization by PI3K: identification of a regulatory cytoplasmic motif.
J Leukoc Biol. 87, 443-449
- CIESEK, S., S. WESTHAUS, M. WICHT, I. WAPPLER, S. HENSCHEN, C. SARRAZIN, N. HAMDI, A. I. ABDELAZIZ, C. P. STRASSBURG, H. WEDEMEYER, M. P. MANNS, T. PIETSCHMANN u. T. VON HAHN (2011):
Impact of intra- and interspecies variation of occludin on its function as coreceptor for authentic hepatitis C virus particles.
J Virol. 85, 7613-7621
- CONNOR, R. I., B. K. CHEN, S. CHOE u. N. R. LANDAU (1995):
Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes.
Virology. 206, 935-944
- COTE, M., J. MISASI, T. REN, A. BRUCHEZ, K. LEE, C. M. FILONE, L. HENSLEY, Q. LI, D. ORY, K. CHANDRAN u. J. CUNNINGHAM (2011):
Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection.
Nature. 477, 344-348
- CROSIER, K. E., L. R. HALL, P. M. LEWIS, C. M. MORRIS, C. R. WOOD, J. C. MORRIS u. P. S. CROSIER (1994):
Isolation and characterization of the human DTK receptor tyrosine kinase.
Growth Factors. 11, 137-144
- DAVIES, J. Q. u. S. GORDON (2005):
Isolation and culture of human macrophages.
Methods Mol Biol. 290, 105-116

DECATHELINÉAU, A. M. u. P. M. HENSON (2003):

The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave.

Essays Biochem. 39, 105-117

DEVITT, A., O. D. MOFFATT, C. RAYKUNDALIA, J. D. CAPRA, D. L. SIMMONS u. C. D. GREGORY (1998):

Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells.

Nature. 392, 505-509

DEVITT, A., S. PIERCE, C. OLDREIVE, W. H. SHINGLER u. C. D. GREGORY (2003):

CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine.

Cell Death Differ. 10, 371-382

DEVLIN, C., N. H. PIPALIA, X. LIAO, E. H. SCHUCHMAN, F. R. MAXFIELD u. I. TABAS (2010):

Improvement in lipid and protein trafficking in Niemann-Pick C1 cells by correction of a secondary enzyme defect.

Traffic. 11, 601-615

DEWITTE-ORR, S. J., S. E. COLLINS, C. M. BAUER, D. M. BOWDISH u. K. L. MOSSMAN (2010):

An accessory to the 'Trinity': SR-As are essential pathogen sensors of extracellular dsRNA, mediating entry and leading to subsequent type I IFN responses.

PLoS Pathog. 6, e1000829

DI PASQUALE, G. u. J. A. CHIORINI (2006):

AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium.

Mol Ther. 13, 506-516

DINI, L., F. AUTUORI, A. LENTINI, S. OLIVERIO u. M. PIACENTINI (1992):

The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor.

FEBS Lett. 296, 174-178

- DOMINGUEZ-SOTO, A., L. ARAGONESES-FENOLL, E. MARTIN-GAYO, L. MARTINEZ-PRATS, M. COLMENARES, M. NARANJO-GOMEZ, F. E. BORRAS, P. MUNOZ, M. ZUBIAUR, M. L. TORIBIO, R. DELGADO u. A. L. CORBI (2007):
The DC-SIGN-related lectin LSEctin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells.
Blood. 109, 5337-5345
- DOWELL, S. F., R. MUKUNU, T. G. KSIAZEK, A. S. KHAN, P. E. ROLLIN u. C. J. PETERS (1999):
Transmission of Ebola hemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit.
J Infect Dis. 179 Suppl 1, S87-91
- DUBE, D., M. B. BRECHER, S. E. DELOS, S. C. ROSE, E. W. PARK, K. L. SCHORNBERG, J. H. KUHN u. J. M. WHITE (2009):
The Primed Ebolavirus Glycoprotein (19-Kilodalton GP1,2): Sequence and Residues Critical for Host Cell Binding.
J Virol. 83, 2883-2891
- DUBE, D., K. L. SCHORNBERG, C. J. SHOEMAKER, S. E. DELOS, T. S. STANTCHEV, K. A. CLOUSE, C. C. BRODER u. J. M. WHITE (2010):
Cell adhesion-dependent membrane trafficking of a binding partner for the ebolavirus glycoprotein is a determinant of viral entry.
Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 16637-16642
- DUBE, D., K. L. SCHORNBERG, T. S. STANTCHEV, M. I. BONAPARTE, S. E. DELOS, A. H. BOUTON, C. C. BRODER u. J. M. WHITE (2008):
Cell adhesion promotes Ebola virus envelope glycoprotein-mediated binding and infection.
J Virol. 82, 7238-7242
- DUNNE, D. W., D. RESNICK, J. GREENBERG, M. KRIEGER u. K. A. JOINER (1994):
The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid.
Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 1863-1867

- ERWIG, L. P. u. P. M. HENSON (2008):
Clearance of apoptotic cells by phagocytes.
Cell Death Differ. 15, 243-250
- FEIGELSTOCK, D., P. THOMPSON, P. MATTOO, Y. ZHANG u. G. G. KAPLAN
(1998):
The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor.
J Virol. 72, 6621-6628
- FELDMANN, H. u. T. W. GEISBERT (2011):
Ebola haemorrhagic fever.
The Lancet. 377, 849-862
- FELDMANN, H., V. E. VOLCHKOV, V. A. VOLCHKOVA, U. STROHER u. H. D.
KLENK (2001):
Biosynthesis and role of filoviral glycoproteins.
J Gen Virol. 82, 2839-2848
- FRANCICA, J. R., A. VARELA-ROHENA, A. MEDVEC, G. PLESA, J. L. RILEY u. P.
BATES (2010):
Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced
by the ebola virus glycoprotein.
PLoS Pathog. 6, e1001098
- FRASER, I., D. HUGHES u. S. GORDON (1993):
Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal
antibody to murine scavenger receptor.
Nature. 364, 343-346
- FREEMAN, G. J., J. M. CASASNOVAS, D. T. UMETSU u. R. H. DEKRUYFF (2010):
TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate
innate and adaptive immunity.
Immunol Rev. 235, 172-189
- GARDAI, S. J., K. A. MCPHILLIPS, S. C. FRASCH, W. J. JANSSEN, A.
STAREFELDT, J. E. MURPHY-ULLRICH, D. L. BRATTON, P. A.
OLDENBORG, M. MICHALAK u. P. M. HENSON (2005):
Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through
trans-activation of LRP on the phagocyte.
Cell. 123, 321-334

- GEIJTENBEEK, T. B., R. TORENSMA, S. J. VAN VLIET, G. C. VAN DUIJNHOVEN, G. J. ADEMA, Y. VAN KOOYK u. C. G. FIGDOR (2000):
Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.
Cell. 100, 575-585
- GEISBERT, T. W. (2003):
Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection.
Am J Pathol. 163, 2347-2370
- GEISBERT, T. W., L. E. HENSLEY, T. LARSEN, H. A. YOUNG, D. S. REED, J. B. GEISBERT, D. P. SCOTT, E. KAGAN, P. B. JAHRLING u. K. J. DAVIS (2003a):
Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection.
Am J Pathol. 163, 2347-2370
- GEISBERT, T. W., H. A. YOUNG, P. B. JAHRLING, K. J. DAVIS, E. KAGAN u. L. E. HENSLEY (2003b):
Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event.
J Infect Dis. 188, 1618-1629
- GEISBERT, T. W., H. A. YOUNG, P. B. JAHRLING, K. J. DAVIS, T. LARSEN, E. KAGAN u. L. E. HENSLEY (2003c):
Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells.
Am J Pathol. 163, 2371-2382
- GNIRSS, K., A. KUHL, C. KARSTEN, I. GLOWACKA, S. BERTRAM, F. KAUP, H. HOFMANN u. S. POHLMANN (2012):
Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of Tmprss2 expression.
Virology. 424, 3-10

- GORDON, S. u. P. R. TAYLOR (2005):
Monocyte and macrophage heterogeneity.
Nat Rev Immunol. 5, 953-964
- GOUGH, P. J., D. R. GREAVES u. S. GORDON (1998):
A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake.
J Lipid Res. 39, 531-543
- GOUGH, P. J., D. R. GREAVES, H. SUZUKI, T. HAKKINEN, M. O. HILTUNEN, M. TURUNEN, S. Y. HERTTUALA, T. KODAMA u. S. GORDON (1999):
Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19, 461-471
- GRAHAM, D. K., T. L. DAWSON, D. L. MULLANEY, H. R. SNODGRASS u. H. S. EARP (1994):
Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer.
Cell Growth Differ. 5, 647-657
- GRAMBERG, T., H. HOFMANN, P. MOLLER, P. F. LALOR, A. MARZI, M. GEIER, M. KRUMBIEGEL, T. WINKLER, F. KIRCHHOFF, D. H. ADAMS, S. BECKER, J. MUNCH u. S. POHLMANN (2005):
LSEctin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus.
Virology. 340, 224-236
- GRANELLI-PIPERNO, A., A. PRITSKER, M. PACK, I. SHIMELIOVICH, J. F. ARRIGHI, C. G. PARK, C. TRUMPFHELLER, V. PIGUET, T. M. MORAN u. R. M. STEINMAN (2005):
Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction.
J Immunol. 175, 4265-4273

- GREGORY, S. M., E. HARADA, B. LIANG, S. E. DELOS, J. M. WHITE u. L. K. TAMM (2011):
Structure and function of the complete internal fusion loop from Ebolavirus glycoprotein 2.
Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 11211-11216
- GROSETH, A., A. MARZI, T. HOENEN, A. HERWIG, D. GARDNER, S. BECKER, H. EBIHARA u. H. FELDMANN (2012):
The Ebola virus glycoprotein contributes to but is not sufficient for virulence in vivo.
PLoS Pathog. 8, e1002847
- HANAYAMA, R., M. TANAKA, K. MIWA, A. SHINOHARA, A. IWAMATSU u. S. NAGATA (2002):
Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes.
Nature. 417, 182-187
- HAURUM, J. S., S. THIEL, I. M. JONES, P. B. FISCHER, S. B. LAURSEN u. J. C. JENSENIUS (1993):
Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins.
Aids. 7, 1307-1313
- HAWORTH, R., N. PLATT, S. KESHAV, D. HUGHES, E. DARLEY, H. SUZUKI, Y. KURIHARA, T. KODAMA u. S. GORDON (1997):
The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock.
J Exp Med. 186, 1431-1439
- HE, B., X. QIAO, P. J. KLASSE, A. CHIU, A. CHADBURN, D. M. KNOWLES, J. P. MOORE u. A. CERUTTI (2006):
HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors.
J Immunol. 176, 3931-3941
- HEIN, R. M. u. M. L. WOODS (2007):
TIM-1 regulates macrophage cytokine production and B7 family member expression.
Immunol Lett. 108, 103-108

HIGASHI, N., K. FUJIOKA, K. DENDA-NAGAI, S. HASHIMOTO, S. NAGAI, T. SATO, Y. FUJITA, A. MORIKAWA, M. TSUIJI, M. MIYATA-TAKEUCHI, Y. SANO, N. SUZUKI, K. YAMAMOTO, K. MATSUSHIMA u. T. IRIMURA (2002a):

The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells.

J Biol Chem. 277, 20686-20693

HIGASHI, N., A. MORIKAWA, K. FUJIOKA, Y. FUJITA, Y. SANO, M. MIYATA-TAKEUCHI, N. SUZUKI u. T. IRIMURA (2002b):

Human macrophage lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is a marker for cells at an intermediate stage in their differentiation from monocytes into macrophages.

Int Immunol. 14, 545-554

HOENEN, T., A. GROSETH, D. FALZARANO u. H. FELDMANN (2006):

Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease.

Trends Mol Med. 12, 206-215

HOFFMANN, P. R. (2001):

Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells.

The Journal of Cell Biology. 155, 649-660

HOFMANN-WINKLER, H., F. KAUP u. S. PÖHLMANN (2012):

Host Cell Factors in Filovirus Entry: Novel Players, New Insights.

Viruses. 4, 3336-3362

HOFMANN, H., M. GEIER, A. MARZI, M. KRUMBIEGEL, M. PEIPP, G. H. FEY, T. GRAMBERG u. S. POHLMANN (2004):

Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor.

Biochem Biophys Res Commun. 319, 1216-1221

- HOFMANN, H., K. PYRC, L. VAN DER HOEK, M. GEIER, B. BERKHOUT u. S. POHLMANN (2005):
Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry.
Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 7988-7993
- HOLMSKOV, U., S. THIEL u. J. C. JENSENIUS (2003):
Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense.
Annu Rev Immunol. 21, 547-578
- HOOD, C. L., J. ABRAHAM, J. C. BOYINGTON, K. LEUNG, P. D. KWONG u. G. J. NABEL (2010):
Biochemical and structural characterization of cathepsin L-processed Ebola virus glycoprotein: implications for viral entry and immunogenicity.
J Virol. 84, 2972-2982
- HUANG, I. C., C. C. BAILEY, J. L. WEYER, S. R. RADOSHITZKY, M. M. BECKER, J. J. CHIANG, A. L. BRASS, A. A. AHMED, X. CHI, L. DONG, L. E. LONGOBARDI, D. BOLTZ, J. H. KUHN, S. J. ELLEDGE, S. BAVARI, M. R. DENISON, H. CHOE u. M. FARZAN (2011):
Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus.
PLoS Pathog. 7, e1001258
- HUGGINS, J. W. (1989):
Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug.
Rev Infect Dis. 11 Suppl 4, S750-761
- HUNT, C. L., A. A. KOLOKOLTSOV, R. A. DAVEY u. W. MAURY (2011):
The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus.
J Virol. 85, 334-347
- HYNES, R. O. (2002):
Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.
Cell. 110, 673-687

- ICHIMURA, T., E. J. ASSELDONK, B. D. HUMPHREYS, L. GUNARATNAM, J. S. DUFFIELD u. J. V. BONVENTRE (2008):
Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells.
J Clin Invest. 118, 1657-1668
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, Leuven, Belgien (2012):
Virus Taxonomy: 2012 Release [Online]
<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>
- ITO, H., S. WATANABE, A. TAKADA u. Y. KAWAOKA (2001):
Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies.
J Virol. 75, 1576-1580
- JAHRLING, P. B., J. B. GEISBERT, J. R. SWEARENGEN, T. LARSEN u. T. W. GEISBERT (2007):
Ebola hemorrhagic fever: evaluation of passive immunotherapy in nonhuman primates.
J Infect Dis. 196 Suppl 2, S400-403
- JASENOSKY, L. D. u. Y. KAWAOKA (2004):
Filovirus budding.
Virus Res. 106, 181-188
- JEFFERS, S. A., D. A. SANDERS u. A. SANCHEZ (2002):
Covalent Modifications of the Ebola Virus Glycoprotein.
J Virol. 76, 12463-12472
- JEMIELITY, S., J. J. WANG, Y. K. CHAN, A. A. AHMED, W. LI, S. MONAHAN, X. BU, M. FARZAN, G. J. FREEMAN, D. T. UMETSU, R. H. DEKRUYFF u. H. CHOE (2013):
TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine.
PLoS Pathog. 9, e1003232
- JERSMANN, H. P. A. (2005):
Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells.
Immunology and Cell Biology. 83, 462-467

- JI, X., G. G. OLINGER, S. ARIS, Y. CHEN, H. GEWURZ u. G. T. SPEAR (2005):
Mannose-binding lectin binds to Ebola and Marburg envelope glycoproteins, resulting in blocking of virus interaction with DC-SIGN and complement-mediated virus neutralization.
J Gen Virol. 86, 2535-2542
- JINUSHI, M., Y. NAKAZAKI, M. DOUGAN, D. R. CARRASCO, M. MIHM u. G. DRANOFF (2007):
MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF.
J Clin Invest. 117, 1902-1913
- JOHNSON, E., N. JAAX, J. WHITE u. P. JAHRLING (1995):
Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus.
Int J Exp Pathol. 76, 227-236
- JOHNSON, K. M., J. V. LANGE, P. A. WEBB u. F. A. MURPHY (1977):
Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire.
Lancet. 1, 569-571
- KAPLAN, G., A. TOTSUKA, P. THOMPSON, T. AKATSUKA, Y. MORITSUGU u. S. M. FEINSTONE (1996):
Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus.
EMBO J. 15, 4282-4296
- KELEMEN, L. E. (2006):
The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander?
Int J Cancer. 119, 243-250
- KHWAJA, A., P. RODRIGUEZ-VICIANA, S. WENNSTROM, P. H. WARNE u. J. DOWNWARD (1997):
Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway.
EMBO J. 16, 2783-2793

- KOBAYASHI, N., P. KARISOLA, V. PENA-CRUZ, D. M. DORFMAN, M. JINUSHI, S. E. UMETSU, M. J. BUTTE, H. NAGUMO, I. CHERNOVA, B. ZHU, A. H. SHARPE, S. ITO, G. DRANOFF, G. G. KAPLAN, J. M. CASASNOVAS, D. T. UMETSU, R. H. DEKRUYFF u. G. J. FREEMAN (2007):
TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells.
Immunity. 27, 927-940
- KOIVUSALO, M., M. JANSEN, P. SOMERHARJU u. E. IKONEN (2007):
Endocytic trafficking of sphingomyelin depends on its acyl chain length.
Mol Biol Cell. 18, 5113-5123
- KONDRATOWICZ, A. S., C. L. HUNT, R. A. DAVEY, S. CHERRY u. W. J. MAURY (2013):
AMP-activated protein kinase is required for the macropinocytic internalization of ebolavirus.
J Virol. 87, 746-755
- KONDRATOWICZ, A. S., N. J. LENNEMANN, P. L. SINN, R. A. DAVEY, C. L. HUNT, S. MOLLER-TANK, D. K. MEYERHOLZ, P. RENNERT, R. F. MULLINS, M. BRINDLEY, L. M. SANDERSFELD, K. QUINN, M. WELLER, P. B. MCCRAY, JR., J. CHIORINI u. W. MAURY (2011):
T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus.
Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 8426-8431
- KORNS, D., S. C. FRASCH, R. FERNANDEZ-BOYANAPALLI, P. M. HENSON u. D. L. BRATTON (2011):
Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation.
Front Immunol. 2, 57
- KRISHNAN, A., E. H. MILLER, A. S. HERBERT, M. NG, E. NDUNGO, S. P. WHELAN, J. M. DYE u. K. CHANDRAN (2012):
Niemann-Pick C1 (NPC1)/NPC1-like1 chimeras define sequences critical for NPC1's function as a flovirus entry receptor.
Viruses. 4, 2471-2484

- KRISPIN, A., Y. BLEDI, M. ATALLAH, U. TRAHTEMBERG, I. VERBOVETSKI, E. NAHARI, O. ZELIG, M. LINIAL u. D. MEVORACH (2006):
Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states.
Blood. 108, 3580-3589
- KRYSKO, D. V., G. DENECKER, N. FESTJENS, S. GABRIELS, E. PARTHOENS, K. D'HERDE u. P. VANDENABEELE (2006):
Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells.
Cell Death and Differentiation. 13, 2011-2022
- KUHL, A. u. S. POHLMANN (2012):
How Ebola virus counters the interferon system.
Zoonoses Public Health. 59 Suppl 2, 116-131
- KUHN, J. H., Y. BAO, S. BAVARI, S. BECKER, S. BRADFUTE, J. R. BRISTER, A. A. BUKREYEV, Y. CAI, K. CHANDRAN, R. A. DAVEY, O. DOLNIK, J. M. DYE, S. ENTERLEIN, J. P. GONZALEZ, P. FORMENTY, A. N. FREIBERG, L. E. HENSLEY, A. N. HONKO, G. M. IGNATYEV, P. B. JAHRLING, K. M. JOHNSON, H. D. KLENK, G. KOBINGER, M. G. LACKEMEYER, E. M. LEROY, M. S. LEVER, L. L. LOFTS, E. MUHLBERGER, S. V. NETESOV, G. G. OLINGER, G. PALACIOS, J. L. PATTERSON, J. T. PAWESKA, L. PITT, S. R. RADOSHITZKY, E. I. RYABCHIKOVA, E. O. SAPHIRE, A. M. SHESTOPALOV, S. J. SMITHER, N. J. SULLIVAN, R. SWANEPOEL, A. TAKADA, J. S. TOWNER, G. VAN DER GROEN, V. E. VOLCHKOV, V. WAHL-JENSEN, T. K. WARREN, K. L. WARFIELD, M. WEIDMANN u. S. T. NICHOL (2013):
Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for laboratory animal-adapted strains and variants of viruses assigned to the family Filoviridae.
Arch Virol. 158, 1425-1432
- KUHN, J. H., S. R. RADOSHITZKY, A. C. GUTH, K. L. WARFIELD, W. LI, M. J. VINCENT, J. S. TOWNER, S. T. NICHOL, S. BAVARI, H. CHOE, M. J. AMAN u. M. FARZAN (2006):
Conserved receptor-binding domains of Lake Victoria marburgvirus and Zaire ebolavirus bind a common receptor.
J Biol Chem. 281, 15951-15958

- LEE, J. E., M. L. FUSCO, A. J. HESSELL, W. B. OSWALD, D. R. BURTON u. E. O. SAPHIRE (2008):
Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor.
Nature. 454, 177-182
- LEE, J. E. u. E. O. SAPHIRE (2009):
Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry.
Future Virol. 4, 621-635
- LEE, K., T. REN, M. COTE, B. GHOLAMREZA, J. MISASI, A. BRUCHEZ u. J. CUNNINGHAM (2013):
Inhibition of Ebola Virus Infection: Identification of Niemann-Pick C1 as the Target by Optimization of a Chemical Probe.
ACS Med Chem Lett. 4, 239-243
- LEMKE, G. (2013):
Biology of the TAM receptors.
Cold Spring Harb Perspect Biol. 5, a009076
- LEMKE, G. u. C. V. ROTHLIN (2008):
Immunobiology of the TAM receptors.
Nat Rev Immunol. 8, 327-336
- LENNEMANN, N. J., B. A. RHEIN, E. NDUNGO, K. CHANDRAN, X. QIU u. W. MAURY (2014):
Comprehensive functional analysis of N-linked glycans on Ebola virus GP1.
MBio. 5, e00862-00813
- LEROY, E. M., B. KUMULUNGUI, X. POURRUT, P. ROUQUET, A. HASSANIN, P. YABA, A. DELICAT, J. T. PAWESKA, J. P. GONZALEZ u. R. SWANEPOEL (2005):
Fruit bats as reservoirs of Ebola virus.
Nature. 438, 575-576

- LEROY, E. M., P. ROUQUET, P. FORMENTY, S. SOUQUIERE, A. KILBOURNE, J. M. FROMENT, M. BERMEJO, S. SMIT, W. KARESH, R. SWANEPOEL, S. R. ZAKI u. P. E. ROLLIN (2004):
Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife.
Science. 303, 387-390
- LIAO, D., X. WANG, M. LI, P. H. LIN, Q. YAO u. C. CHEN (2009):
Human protein S inhibits the uptake of AcLDL and expression of SR-A through Mer receptor tyrosine kinase in human macrophages.
Blood. 113, 165-174
- LIN, G., G. SIMMONS, S. POHLMANN, F. BARIBAUD, H. NI, G. J. LESLIE, B. S. HAGGARTY, P. BATES, D. WEISSMAN, J. A. HOXIE u. R. W. DOMS (2003):
Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR.
J Virol. 77, 1337-1346
- LINGER, R. M., A. K. KEATING, H. S. EARP u. D. K. GRAHAM (2008):
TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer.
Adv Cancer Res. 100, 35-83
- LIU, W., L. TANG, G. ZHANG, H. WEI, Y. CUI, L. GUO, Z. GOU, X. CHEN, D. JIANG, Y. ZHU, G. KANG u. F. HE (2004):
Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSEctin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node.
J Biol Chem. 279, 18748-18758
- LOPEZ, M., C. MARTINACHE, S. CANEPA, M. CHOKRI, F. SCOTTO u. J. BARTHOLEYNS (1993):
Autologous lymphocytes prevent the death of monocytes in culture and promote, as do GM-CSF, IL-3 and M-CSF, their differentiation into macrophages.
J Immunol Methods. 159, 29-38

- LU, Q., M. GORE, Q. ZHANG, T. CAMENISCH, S. BOAST, F. CASAGRANDA, C. LAI, M. K. SKINNER, R. KLEIN, G. K. MATSUSHIMA, H. S. EARP, S. P. GOFF u. G. LEMKE (1999):
Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis.
Nature. 398, 723-728
- MALASHKEVICH, V. N., P. STROP, J. W. KELLER, J. N. JANSONIUS u. M. D. TONEY (1999):
Crystal structures of dialkylglycine decarboxylase inhibitor complexes.
J Mol Biol. 294, 193-200
- MANICASSAMY, B., J. WANG, H. JIANG u. L. RONG (2005):
Comprehensive analysis of Ebola virus GP1 in viral entry.
J Virol. 79, 4793-4805
- MARK, M. R., D. T. SCADDEN, Z. WANG, Q. GU, A. GODDARD u. P. J. GODOWSKI (1994):
rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain.
J Biol Chem. 269, 10720-10728
- MARTINEZ-POMARES, L. (2012):
The mannose receptor.
J Leukoc Biol. 92, 1177-1186
- MARTINEZ, O., J. JOHNSON, B. MANICASSAMY, L. RONG, G. G. OLINGER, L. E. HENSLEY u. C. F. BASLER (2010):
Zaire Ebola virus entry into human dendritic cells is insensitive to cathepsin L inhibition.
Cell Microbiol. 12, 148-157
- MARTINEZ, O., J. C. JOHNSON, A. HONKO, B. YEN, R. S. SHABMAN, L. E. HENSLEY, G. G. OLINGER u. C. F. BASLER (2013):
Ebola virus exploits a monocyte differentiation program to promote its entry.
J Virol. 87, 3801-3814

- MARZI, A., A. AKHAVAN, G. SIMMONS, T. GRAMBERG, H. HOFMANN, P. BATES, V. R. LINGAPPA u. S. POHLMANN (2006):
The signal peptide of the ebolavirus glycoprotein influences interaction with the cellular lectins DC-SIGN and DC-SIGNR.
J Virol. 80, 6305-6317
- MARZI, A., T. GRAMBERG, G. SIMMONS, P. MOLLER, A. J. RENNEKAMP, M. KRUMBIEGEL, M. GEIER, J. EISEMANN, N. TURZA, B. SAUNIER, A. STEINKASSERER, S. BECKER, P. BATES, H. HOFMANN u. S. POHLMANN (2004):
DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus.
J Virol. 78, 12090-12095
- MARZI, A., P. MOLLER, S. L. HANNA, T. HARRER, J. EISEMANN, A. STEINKASSERER, S. BECKER, F. BARIBAUD u. S. POHLMANN (2007):
Analysis of the interaction of Ebola virus glycoprotein with DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) and its homologue DC-SIGNR.
J Infect Dis. 196 Suppl 2, S237-246
- MARZI, A., T. REINHECKEL u. H. FELDMANN (2012):
Cathepsin B & L are not required for ebola virus replication.
PLoS Negl Trop Dis. 6, e1923
- MATEO, M., S. P. REID, L. W. LEUNG, C. F. BASLER u. V. E. VOLCHKOV (2010):
Ebolavirus VP24 binding to karyopherins is required for inhibition of interferon signaling.
J Virol. 84, 1169-1175
- MCINTIRE, J. J., S. E. UMETSU, C. MACAUBAS, E. G. HOYTE, C. CINNIUGLU, L. L. CAVALLI-SFORZA, G. S. BARSH, J. F. HALLMAYER, P. A. UNDERHILL, N. J. RISCH, G. J. FREEMAN, R. H. DEKRUYFF u. D. T. UMETSU (2003):
Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease.
Nature. 425, 576
- MEHEDI, M., D. FALZARANO, J. SEEBACH, X. HU, M. S. CARPENTER, H. J. SCHNITTLER u. H. FELDMANN (2011):
A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing.
J Virol. 85, 5406-5414

MERCER, J. u. A. HELENIUS (2008):

Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells.

Science. 320, 531-535

MERCER, J. u. A. HELENIUS (2009):

Virus entry by macropinocytosis.

Nat Cell Biol. 11, 510-520

MERCER, J., M. SCHELHAAS u. A. HELENIUS (2010):

Virus Entry by Endocytosis.

Annual Review of Biochemistry. 79, 803-833

MEYERS, J. H., S. CHAKRAVARTI, D. SCHLESINGER, Z. ILLES, H. WALDNER, S. E. UMETSU, J. KENNY, X. X. ZHENG, D. T. UMETSU, R. H. DEKRUYFF, T. B. STROM u. V. K. KUCHROO (2005):

TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation.

Nat Immunol. 6, 455-464

MILLER, E. H., G. OBERNOSTERER, M. RAABEN, A. S. HERBERT, M. S. DEFFIEU, A. KRISHNAN, E. NDUNGO, R. G. SANDESARA, J. E. CARETTE, A. I. KUEHNE, G. RUTHEL, S. R. PFEFFER, J. M. DYE, S. P. WHELAN, T. R. BRUMMELKAMP u. K. CHANDRAN (2012a):

Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor.

EMBO J. 31, 1947-1960

MILLER, M. E., S. ADHIKARY, A. A. KOLOKOLTSOV u. R. A. DAVEY (2012b):

Ebolavirus requires acid sphingomyelinase activity and plasma membrane sphingomyelin for infection.

J Virol. 86, 7473-7483

MIRANDA, M. E. u. N. L. MIRANDA (2011):

Reston ebolavirus in humans and animals in the Philippines: a review.

J Infect Dis. 204 Suppl 3, S757-760

- MITCHELL, D. A., A. J. FADDEN u. K. DRICKAMER (2001):
A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands.
J Biol Chem. 276, 28939-28945
- MIYANISHI, M., K. TADA, M. KOIKE, Y. UCHIYAMA, T. KITAMURA u. S. NAGATA (2007):
Identification of TIM-4 as a phosphatidylserine receptor.
Nature. 450, 435-439
- MODROW, S., D. FALKE, U. TRUYEN u. H. SCHÄTZL (2010):
Molekulare Virologie.
3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S. 313-323
- MOFFATT, O. D., A. DEVITT, E. D. BELL, D. L. SIMMONS u. C. D. GREGORY (1999):
Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes.
J Immunol. 162, 6800-6810
- MOLLER-TANK, S., A. S. KONDRATOWICZ, R. A. DAVEY, P. D. RENNERT u. W. MAURY (2013):
Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry.
J Virol. 87, 8327-8341
- MORIZONO, K., Y. XIE, T. OLAFSEN, B. LEE, A. DASGUPTA, A. M. WU u. I. S. CHEN (2011):
The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry.
Cell Host Microbe. 9, 286-298
- MUHLBERGER, E. (2007):
Filovirus replication and transcription.
Future Virol. 2, 205-215
- MUHLBERGER, E., M. WEIK, V. E. VOLCHKOV, H. D. KLENK u. S. BECKER (1999):
Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems.
J Virol. 73, 2333-2342

- MULHERKAR, N., M. RAABEN, J. C. DE LA TORRE, S. P. WHELAN u. K. CHANDRAN (2011):
The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway.
Virology. 419, 72-83
- MUPAPA, K. (1999):
Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients. International Scientific and Technical Committee.
J Infect Dis. 179, 18-23
- NAGATA, K., K. OHASHI, T. NAKANO, H. ARITA, C. ZONG, H. HANAFUSA u. K. MIZUNO (1996):
Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases.
J Biol Chem. 271, 30022-30027
- NAKAYAMA, M., H. AKIBA, K. TAKEDA, Y. KOJIMA, M. HASHIGUCHI, M. AZUMA, H. YAGITA u. K. OKUMURA (2009):
Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation.
Blood. 113, 3821-3830
- NALDINI, L., U. BLOMER, P. GALLAY, D. ORY, R. MULLIGAN, F. H. GAGE, I. M. VERMA u. D. TRONO (1996):
In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.
Science. 272, 263-267
- NANBO, A., M. IMAI, S. WATANABE, T. NODA, K. TAKAHASHI, G. NEUMANN, P. HALFMANN u. Y. KAWAOKA (2010):
Ebola virus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner.
PLoS Pathog. 6, e1001121
- NAUTA, A. J., G. CASTELLANO, W. XU, A. M. WOLTMAN, M. C. BORRIAS, M. R. DAHA, C. VAN KOOTEN u. A. ROOS (2004):
Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells.
J Immunol. 173, 3044-3050

- NEGREDO, A., G. PALACIOS, S. VAZQUEZ-MORON, F. GONZALEZ, H. DOPAZO, F. MOLERO, J. JUSTE, J. QUETGLAS, N. SAVJI, M. DE LA CRUZ MARTINEZ, J. E. HERRERA, M. PIZARRO, S. K. HUTCHISON, J. E. ECHEVARRIA, W. I. LIPKIN u. A. TENORIO (2011):
Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe.
PLoS Pathog. 7, e1002304
- NEUBAUER, A., A. FIEBELER, D. K. GRAHAM, J. P. O'BRYAN, C. A. SCHMIDT, P. BARCKOW, S. SERKE, W. SIEGERT, H. R. SNODGRASS, D. HUHN u. ET AL. (1994):
Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis.
Blood. 84, 1931-1941
- NEUMANN, G. (2007):
Proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not critical for Ebola virus replication in nonhuman primates.
J Virol. 81, 2995-2998
- NEUMANN, G., H. FELDMANN, S. WATANABE, I. LUKASHEVICH u. Y. KAWAOKA (2002):
Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture.
J Virol. 76, 406-410
- NIKOLIC, D. M., J. CHOLEWA, C. GASS, M. C. GONG u. S. R. POST (2007):
Class A scavenger receptor-mediated cell adhesion requires the sequential activation of Lyn and PI3-kinase.
Am J Physiol Cell Physiol. 292, C1450-1458
- NIWA, H., K. YAMAMURA u. J. MIYAZAKI (1991):
Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector.
Gene. 108, 193-199
- NODA, T., H. EBIHARA, Y. MURAMOTO, K. FUJII, A. TAKADA, H. SAGARA, J. H. KIM, H. KIDA, H. FELDMANN u. Y. KAWAOKA (2006):
Assembly and budding of Ebolavirus.
PLoS Pathog. 2, e99

- NOYORI, O., K. MATSUNO, M. KAJIHARA, E. NAKAYAMA, M. IGARASHI, M. KURODA, N. ISODA, R. YOSHIDA u. A. TAKADA (2013):
Differential potential for envelope glycoprotein-mediated steric shielding of host cell surface proteins among filoviruses.
Virology. 446, 152-161
- OGDEN, C. A., A. DECATHELINEAU, P. R. HOFFMANN, D. BRATTON, B. GHEBREHIWET, V. A. FADOK u. P. M. HENSON (2001):
C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells.
J Exp Med. 194, 781-795
- OKA, K., T. SAWAMURA, K. KIKUTA, S. ITOKAWA, N. KUME, T. KITA u. T. MASAKI (1998):
Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 9535-9540
- OLINGER, G. G., JR., J. PETTITT, D. KIM, C. WORKING, O. BOHOROV, B. BRATCHER, E. HIATT, S. D. HUME, A. K. JOHNSON, J. MORTON, M. PAULY, K. J. WHALEY, C. M. LEAR, J. E. BIGGINS, C. SCULLY, L. HENSLEY u. L. ZEITLIN (2012):
Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques.
Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 18030-18035
- PARLATO, S., G. ROMAGNOLI, F. SPADARO, I. CANINI, P. SIRABELLA, P. BORGHI, C. RAMONI, I. FILESI, S. BIOCCA, L. GABRIELE u. F. BELARDELLI (2010):
LOX-1 as a natural IFN-alpha-mediated signal for apoptotic cell uptake and antigen presentation in dendritic cells.
Blood. 115, 1554-1563
- PATTYN, S., G. VAN DER GROEN, G. COURTEILLE, W. JACOB u. P. PIOT (1977):
Isolation of Marburg-like virus from a case of haemorrhagic fever in Zaire.
Lancet. 1, 573-574

PATTYN, S. R. (1978):

Ebola Virus Haemorrhagic Fever.

1. Aufl. Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, S. 16-30

PETTITT J, Z. L., KIM DH (2013):

Therapeutic Intervention of Ebola Virus Infection in Rhesus Macaques with the MB-003 Monoclonal Antibody Cocktail.

Science translational medicine. 5/199, 199ra113

PLATT, N., H. SUZUKI, T. KODAMA u. S. GORDON (2000):

Apoptotic thymocyte clearance in scavenger receptor class A-deficient mice is apparently normal.

J Immunol. 164, 4861-4867

PLATT, N., H. SUZUKI, Y. KURIHARA, T. KODAMA u. S. GORDON (1996):

Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro.

Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 12456-12460

POHLMANN, S., F. BARIBAUD, B. LEE, G. J. LESLIE, M. D. SANCHEZ, K. HIEBENTHAL-MILLOW, J. MUNCH, F. KIRCHHOFF u. R. W. DOMS (2001a):

DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus.

J Virol. 75, 4664-4672

POHLMANN, S., E. J. SOILLEUX, F. BARIBAUD, G. J. LESLIE, L. S. MORRIS, J. TROWSDALE, B. LEE, N. COLEMAN u. R. W. DOMS (2001b):

DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans.

Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 2670-2675

POLISHCHUK, R., A. D. PENTIMA u. J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ (2004):

Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway.

Nat Cell Biol. 6, 297-307

- POWLESLAND, A. S., T. FISCH, M. E. TAYLOR, D. F. SMITH, B. TISSOT, A. DELL, S. POHLMANN u. K. DRICKAMER (2008):
A novel mechanism for LSECtin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans.
J Biol Chem. 283, 593-602
- PRIETO, A. L., J. L. WEBER u. C. LAI (2000):
Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and mer in the developing rat central nervous system.
J Comp Neurol. 425, 295-314
- QUINN, K., M. A. BRINDLEY, M. L. WELLER, N. KALUDOV, A. KONDRATOWICZ, C. L. HUNT, P. L. SINN, P. B. MCCRAY, JR., C. S. STEIN, B. L. DAVIDSON, R. FLICK, R. MANDELL, W. STAPLIN, W. MAURY u. J. A. CHIORINI (2009):
Rho GTPases modulate entry of Ebola virus and vesicular stomatitis virus pseudotyped vectors.
J Virol. 83, 10176-10186
- RADOSHITZKY, S. R., K. L. WARFIELD, X. CHI, L. DONG, K. KOTA, S. B. BRADFUTE, J. D. GEARHART, C. RETTERER, P. J. KRANZUSCH, J. N. MISASI, M. A. HOGENBIRK, V. WAHL-JENSEN, V. E. VOLCHKOV, J. M. CUNNINGHAM, P. B. JAHRLING, M. J. AMAN, S. BAVARI, M. FARZAN u. J. H. KUHN (2011):
Ebolavirus delta-peptide immunoadhesins inhibit marburgvirus and ebolavirus cell entry.
J Virol. 85, 8502-8513
- RAVICHANDRAN, K. S. (2011):
Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways.
Immunity. 35, 445-455
- RAYCROFT, M. T., B. P. HARVEY, M. J. BRUCK u. M. J. MAMULA (2012):
Inhibition of antigen trafficking through scavenger receptor A.
J Biol Chem. 287, 5310-5316

- REID, S. P., L. W. LEUNG, A. L. HARTMAN, O. MARTINEZ, M. L. SHAW, C. CARBONNELLE, V. E. VOLCHKOV, S. T. NICHOL u. C. F. BASLER (2006): Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation.
J Virol. 80, 5156-5167
- RITCHIE, G., D. J. HARVEY, U. STROEHER, F. FELDMANN, H. FELDMANN, V. WAHL-JENSEN, L. ROYLE, R. A. DWEK u. P. M. RUDD (2010): Identification of N-glycans from Ebola virus glycoproteins by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight and negative ion electrospray tandem mass spectrometry.
Rapid Commun Mass Spectrom. 24, 571-585
- SAEED, M. F., A. A. KOLOKOLTSOV, T. ALBRECHT u. R. A. DAVEY (2010): Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes.
PLoS Pathog. 6, e1001110
- SAEED, M. F., A. A. KOLOKOLTSOV, A. N. FREIBERG, M. R. HOLBROOK u. R. A. DAVEY (2008): Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus.
PLoS Pathog. 4, e1000141
- SANCHEZ, A. (1998): Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus.
J Virol. 72, 6442-6447
- SANCHEZ, A. (2007): Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity.
J Infect Dis. 196 Suppl 2, S251-258
- SANCHEZ, A., S. G. TRAPPIER, B. W. MAHY, C. J. PETERS u. S. T. NICHOL (1996): The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing.
Proc Natl Acad Sci USA. 93, 3602-3607

- SATHER, S., K. D. KENYON, J. B. LEFKOWITZ, X. LIANG, B. C. VARNUM, P. M. HENSON u. D. K. GRAHAM (2007):
A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation.
Blood. 109, 1026-1033
- SAVILL, J., I. DRANSFIELD, C. GREGORY u. C. HASLETT (2002):
A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.
Nat Rev Immunol. 2, 965-975
- SAVILL, J., I. DRANSFIELD, N. HOGG u. C. HASLETT (1990):
Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis.
Nature. 343, 170-173
- SAVILL, J., N. HOGG, Y. REN u. C. HASLETT (1992):
Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis.
J Clin Invest. 90, 1513-1522
- SAWAMURA, T., N. KUME, T. AOYAMA, H. MORIWAKI, H. HOSHIKAWA, Y. AIBA, T. TANAKA, S. MIWA, Y. KATSURA, T. KITA u. T. MASAKI (1997):
An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein.
Nature. 386, 73-77
- SCHORNBERG, K. (2006):
Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein.
J Virol. 80, 4174-4178
- SCHORNBERG, K., S. MATSUYAMA, K. KABSCH, S. DELOS, A. BOUTON u. J. WHITE (2006):
Role of Endosomal Cathepsins in Entry Mediated by the Ebola Virus Glycoprotein.
J Virol. 80, 4174-4178

- SCHORNBERG, K. L., C. J. SHOEMAKER, D. DUBE, M. Y. ABSHIRE, S. E. DELOS, A. H. BOUTON u. J. M. WHITE (2009):
Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins.
Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 8003-8008
- SCOTT, C. u. Y. A. IOANNOU (2004):
The NPC1 protein: structure implies function.
Biochim Biophys Acta. 1685, 8-13
- SCOTT, R. S., E. J. MCMAHON, S. M. POP, E. A. REAP, R. CARICCHIO, P. L. COHEN, H. S. EARP u. G. K. MATSUSHIMA (2001):
Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER.
Nature. 411, 207-211
- SEITZ, H. M., T. D. CAMENISCH, G. LEMKE, H. S. EARP u. G. K. MATSUSHIMA (2007):
Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells.
J Immunol. 178, 5635-5642
- SHANKAR, S. L., K. O'GUIN, M. CAMMER, F. A. MCMORRIS, T. N. STITT, R. S. BASCH, B. VARNUM u. B. SHAFIT-ZAGARDO (2003):
The growth arrest-specific gene product Gas6 promotes the survival of human oligodendrocytes via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway.
J Neurosci. 23, 4208-4218
- SHANKAR, S. L., K. O'GUIN, M. KIM, B. VARNUM, G. LEMKE, C. F. BROSANAN u. B. SHAFIT-ZAGARDO (2006):
Gas6/Axl signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.
J Neurosci. 26, 5638-5648
- SHEPHERD, V. L., E. J. CAMPBELL, R. M. SENIOR u. P. D. STAHL (1982):
Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes.
J Reticuloendothel Soc. 32, 423-431

- SHIMOJIMA, M., Y. IKEDA u. Y. KAWAOKA (2007):
The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection.
J Infect Dis. 196 Suppl 2, S259-263
- SHIMOJIMA, M., A. TAKADA, H. EBIHARA, G. NEUMANN, K. FUJIOKA, T. IRIMURA, S. JONES, H. FELDMANN u. Y. KAWAOKA (2006):
Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses.
J Virol. 80, 10109-10116
- SHOEMAKER, C. J., K. L. SCHORNBERG, S. E. DELOS, C. SCULLY, H. PAJOUHESH, G. G. OLINGER, L. M. JOHANSEN u. J. M. WHITE (2013):
Multiple cationic amphiphiles induce a Niemann-Pick C phenotype and inhibit Ebola virus entry and infection.
PLoS One. 8, e56265
- SIEWEKE, M. H. u. J. E. ALLEN (2013):
Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages.
Science. 342, 1242974
- SILVERSTEIN, R. L. u. M. FEBBRAIO (2009):
CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior.
Science Signaling. 2, re3-re3
- SIMMONS, G., J. D. REEVES, C. C. GROGAN, L. H. VANDENBERGHE, F. BARIBAUD, J. C. WHITBECK, E. BURKE, M. J. BUCHMEIER, E. J. SOILLEUX, J. L. RILEY, R. W. DOMS, P. BATES u. S. POHLMANN (2003a):
DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells.
Virology. 305, 115-123
- SIMMONS, G., A. J. RENNEKAMP, N. CHAI, L. H. VANDENBERGHE, J. L. RILEY u. P. BATES (2003b):
Folate Receptor Alpha and Caveolae Are Not Required for Ebola Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection.
J Virol. 77, 13433-13438

- SIMMONS, G., R. J. WOOL-LEWIS, F. BARIBAUD, R. C. NETTER u. P. BATES (2002):
Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence.
J Virol. 76, 2518-2528
- SINN, P. L., M. A. HICKEY, P. D. STABER, D. E. DYLLA, S. A. JEFFERS, B. L. DAVIDSON, D. A. SANDERS u. P. B. MCCRAY (2003):
Lentivirus Vectors Pseudotyped with Filoviral Envelope Glycoproteins Transduce Airway Epithelia from the Apical Surface Independently of Folate Receptor Alpha.
J Virol. 77, 5902-5910
- SOILLEUX, E. J., L. S. MORRIS, G. LESLIE, J. CHEHIMI, Q. LUO, E. LEVRONEY, J. TROWSDALE, L. J. MONTANER, R. W. DOMS, D. WEISSMAN, N. COLEMAN u. B. LEE (2002):
Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro.
J Leukoc Biol. 71, 445-457
- STEPHEN, S. L., K. FREESTONE, S. DUNN, M. W. TWIGG, S. HOMER-VANNIASINKAM, J. H. WALKER, S. B. WHEATCROFT u. S. PONNAMBALAM (2010):
Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease.
Int J Hypertens. 2010, 646929
- STROHER, U. (2001):
Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses.
J Virol. 75, 11025-11033
- STROHER, U. u. H. FELDMANN (2006):
Progress towards the treatment of Ebola haemorrhagic fever.
Expert Opin Investig Drugs. 15, 1523-1535
- SUI, J. u. W. A. MARASCO (2002):
Evidence against Ebola virus sGP binding to human neutrophils by a specific receptor.
Virology. 303, 9-14

- SULAHIAN, T. H., A. IMRICH, G. DELOID, A. R. WINKLER u. L. KOBZIK (2008):
Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry.
Respir Res. 9, 59
- TAKADA, A. (2004):
Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry.
J Virol. 78, 2943-2947
- TAKADA, A., C. ROBISON, H. GOTO, A. SANCHEZ, K. G. MURTI, M. A. WHITT u. Y. KAWAOKA (1997):
A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein.
Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 14764-14769
- TAKADA, A., S. WATANABE, H. ITO, K. OKAZAKI, H. KIDA u. Y. KAWAOKA (2000):
Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry.
Virology. 278, 20-26
- TODT, J. C., B. HU u. J. L. CURTIS (2008):
The scavenger receptor SR-A I/II (CD204) signals via the receptor tyrosine kinase Merck during apoptotic cell uptake by murine macrophages.
J Leukoc Biol. 84, 510-518
- TOWNER, J. S., B. R. AMMAN, T. K. SEALY, S. A. CARROLL, J. A. COMER, A. KEMP, R. SWANEPOEL, C. D. PADDOCK, S. BALINANDI, M. L. KHRISTOVA, P. B. FORMENTY, C. G. ALBARINO, D. M. MILLER, Z. D. REED, J. T. KAYIWA, J. N. MILLS, D. L. CANNON, P. W. GREER, E. BYARUHANGA, E. C. FARNON, P. ATIMNEDI, S. OKWARE, E. KATONGOLE-MBIDDE, R. DOWNING, J. W. TAPPERO, S. R. ZAKI, T. G. KSIAZEK, S. T. NICHOL u. P. E. ROLLIN (2009):
Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats.
PLoS Pathog. 5, e1000536
- TURVILLE, S. G., P. U. CAMERON, A. HANDLEY, G. LIN, S. POHLMANN, R. W. DOMS u. A. L. CUNNINGHAM (2002):
Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets.
Nat Immunol. 3, 975-983

- UMETSU, S. E., W. L. LEE, J. J. MCINTIRE, L. DOWNEY, B. SANJANWALA, O. AKBARI, G. J. BERRY, H. NAGUMO, G. J. FREEMAN, D. T. UMETSU u. R. H. DEKRUYFF (2005):
TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance.
Nat Immunol. 6, 447-454
- URANO, Y., H. WATANABE, S. R. MURPHY, Y. SHIBUYA, Y. GENG, A. A. PEDEN, C. C. Y. CHANG u. T. Y. CHANG (2008):
Transport of LDL-derived cholesterol from the NPC1 compartment to the ER involves the trans-Golgi network and the SNARE protein complex.
Proceedings of the National Academy of Sciences. 105, 16513-16518
- USAMI, K., K. MATSUNO, M. IGARASHI, K. DENDA-NAGAI, A. TAKADA u. T. IRIMURA (2011):
Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin.
Biochem Biophys Res Commun. 407, 74-78
- VANCE, J. E. u. K. B. PEAKE (2011):
Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin.
Curr Opin Lipidol. 22, 204-209
- VANDIVIER, R. W., P. M. HENSON u. I. S. DOUGLAS (2006):
Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease.
Chest. 129, 1673-1682
- VANDIVIER, R. W., C. A. OGDEN, V. A. FADOK, P. R. HOFFMANN, K. K. BROWN, M. BOTTO, M. J. WALPORT, J. H. FISHER, P. M. HENSON u. K. E. GREENE (2002):
Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex.
J Immunol. 169, 3978-3986

- VOLCHKOV, V. E., S. BECKER, V. A. VOLCHKOVA, V. A. TERNOVOJ, A. N. KOTOV, S. V. NETESOV u. H. D. KLENK (1995):
GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases.
Virology. 214, 421-430
- VOLCHKOV, V. E., H. FELDMANN, V. A. VOLCHKOVA u. H. D. KLENK (1998):
Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 5762-5767
- VOLCHKOVA, V. A., H. D. KLENK u. V. E. VOLCHKOV (1999):
Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus.
Virology. 265, 164-171
- WAHL-JENSEN, V., L. BOLLINGER, D. SAFRONETZ, F. DE KOK-MERCADO, D. P. SCOTT u. H. EBIHARA (2012):
Use of the Syrian hamster as a new model of ebola virus disease and other viral hemorrhagic fevers.
Viruses. 4, 3754-3784
- WAHL-JENSEN, V. M., T. A. AFANASIEVA, J. SEEBACH, U. STROHER, H. FELDMANN u. H. J. SCHNITTLER (2005):
Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function.
J Virol. 79, 10442-10450
- WALSH, G.M., D.W. SEXTON, M.G. BLAYLOCK u. C.M. CONVEREY (1999):
Resting and cytokine-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils.
Blood. 94, 2827-2835
- WEINGARTL, H. M., C. EMBURY-HYATT, C. NFON, A. LEUNG, G. SMITH u. G. KOBINGER (2012):
Transmission of Ebola virus from pigs to non-human primates.
Sci Rep. 2, 811

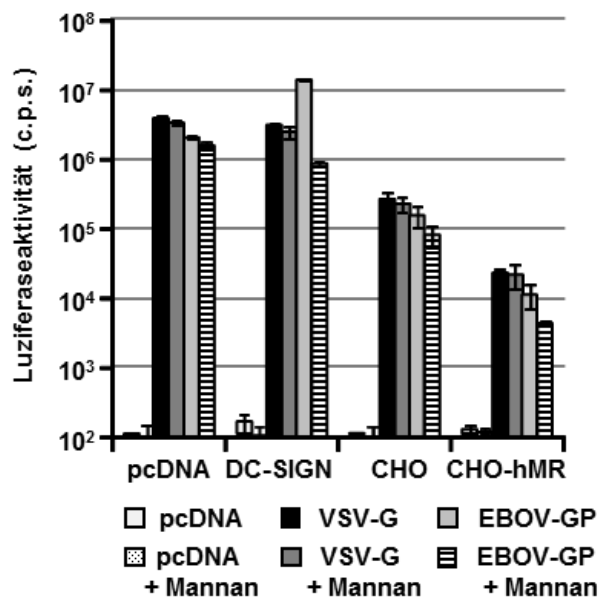
- WEISSENHORN, W., A. CARFI, K. H. LEE, J. J. SKEHEL u. D. C. WILEY (1998):
Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain.
Mol Cell. 2, 605-616
- WEITMAN, S. D., R. H. LARK, L. R. CONEY, D. W. FORT, V. FRASCA, V. R. ZURAWSKI, JR. u. B. A. KAMEN (1992):
Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues.
Cancer Res. 52, 3396-3401
- WONG, A. C., R. G. SANDESARA, N. MULHERKAR, S. P. WHELAN u. K. CHANDRAN (2010):
A forward genetic strategy reveals destabilizing mutations in the Ebolavirus glycoprotein that alter its protease dependence during cell entry.
J Virol. 84, 163-175
- WOOL-LEWIS, R. J. u. P. BATES (1998):
Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines.
J Virol. 72, 3155-3160
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Genf, Schweiz (27. März 2014):
Ebola virus disease in Guinea – update [Online]
http://www.who.int/csr/don/2014_03_27_ebola/en/
- WU, Y., S. SINGH, M. M. GEORGESCU u. R. B. BIRGE (2005):
A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells.
J Cell Sci. 118, 539-553
- YANG, Z., R. DELGADO, L. XU, R. F. TODD, E. G. NABEL, A. SANCHEZ u. G. J. NABEL (1998):
Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins.
Science. 279, 1034-1037

- YANG, Z. Y. (2000):
Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury.
Nature Med. 6, 886-889
- YONEZAWA, A., M. CAVROIS u. W. C. GREENE (2005):
Studies of ebola virus glycoprotein-mediated entry and fusion by using pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 virions: involvement of cytoskeletal proteins and enhancement by tumor necrosis factor alpha.
J Virol. 79, 918-926
- YOSHIMOTO, R., Y. FUJITA, A. KAKINO, S. IWAMOTO, T. TAKAYA u. T. SAWAMURA (2011):
The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance.
Cardiovasc Drugs Ther. 25, 379-391
- ZAKI, S. R. u. C. S. GOLDSMITH (1999):
Pathologic features of filovirus infections in humans.
Curr Top Microbiol Immunol. 235, 97-116
- ZANONI, I. u. F. GRANUCCI (2013):
Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation.
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 3,
- ZHA, X., L. M. PIERINI, P. L. LEOPOLD, P. J. SKIBA, I. TABAS u. F. R. MAXFIELD (1998):
Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis.
J Cell Biol. 140, 39-47
- ZHOU, L., R. SOMASUNDARAM, R. F. NEDERHOF, G. DIJKSTRA, K. N. FABER, M. P. PEPPELENBOSCH u. G. M. FUHLER (2012):
Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies.
Clin Vaccine Immunol. 19, 1065-1074
- ZHU, X. D., Y. ZHUANG, J. J. BEN, L. L. QIAN, H. P. HUANG, H. BAI, J. H. SHA, Z. G. HE u. Q. CHEN (2011):
Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages.
J Biol Chem. 286, 8231-8239

ZIZZO, G., B. A. HILLIARD, M. MONESTIER u. P. L. COHEN (2012):
Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires
M2c polarization and MerTK induction.
J Immunol. 189, 3508-3520

8 Anhang

(A)



(B)

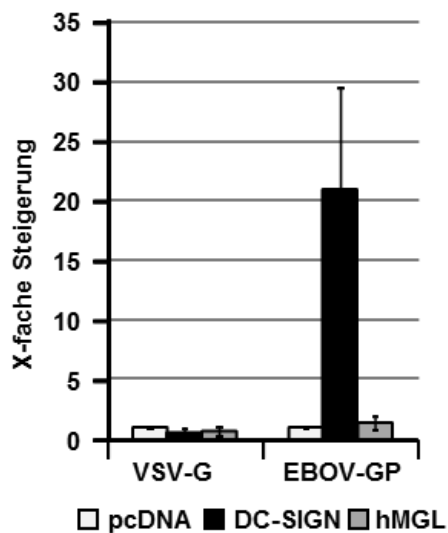
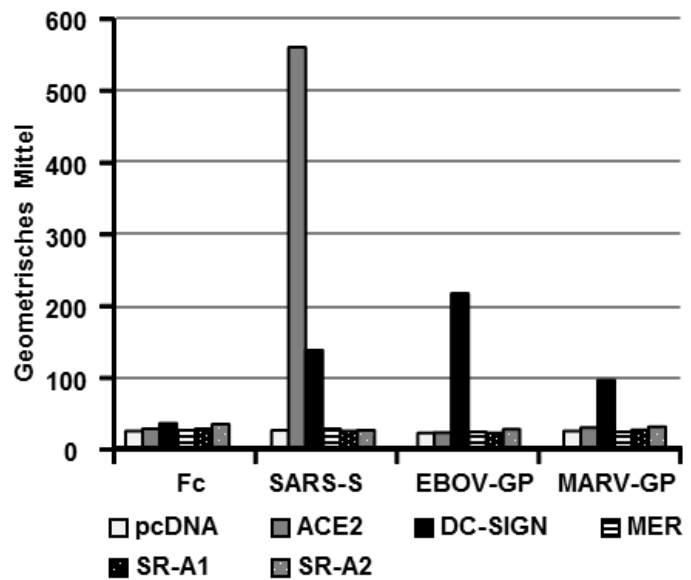
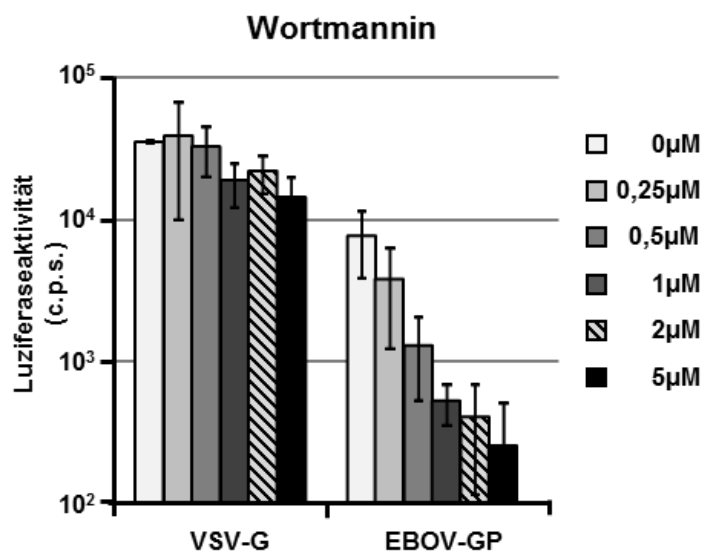


Abbildung S1: Die Lektine hMR und hMGL verstärken den GP-vermittelten Eintritt nicht. (A) Mit pcDNA und DC-SIGN transient transfizierte 293T Zellen wurden parallel zu CHO und CHO, die stabil hMR exprimieren, ausgesät. Vor der Transduktion mit den dargestellten lentiviralen Vektoren wurden die Zellen 30 Min. mit 0,2 mg/ml Mannan oder Wasser präinkubiert. Die Transduktion erfolgte in Triplikaten. 8h nach der Transduktion erfolgte ein Mediumwechsel und 72h später die Zelllyse mit anschließender Messung der Luciferaseaktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Standardabweichungen. (B) 293T Zellen wurden transient mit pcDNA oder den dargestellten Lektinen transfiziert und mit VSV-G oder EBOV-GP transduziert. Anschließend wurde verfahren wie oben beschrieben. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken beziehen sich auf den mittleren Standardfehler (SEM). Die pcDNA-transduzierten Zellen wurden auf 1 gesetzt.

Abbildung S2: Lösliches GP bindet weder SR-A1, SR-A2 noch Mer. 293T Zellen wurden transient mit den dargestellten Rezeptorkandidaten transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit löslichen Proteinen, nach Normalisierung im Western Blot, inkubiert. Fc stellt die lösliche *fragment crystallizable region* dar und ist die Negativkontrolle. Alle anderen löslichen Proteine liegen ebenfalls Fc-gebunden vor. Die Bindung wurde validiert durch einen sekundären, fluoreszierenden Antikörper und im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.



(A)



(B)

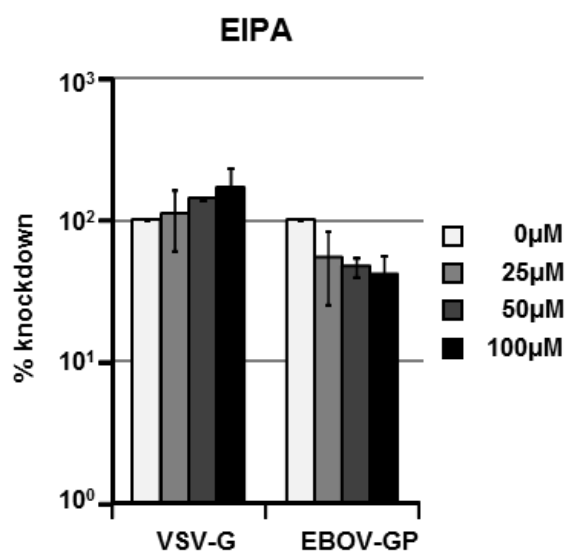
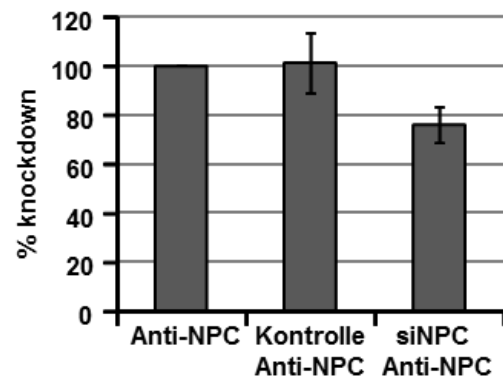


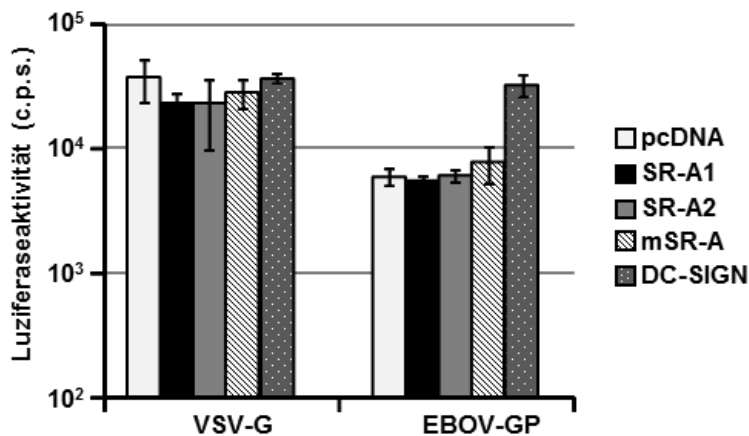
Abbildung S3: Die GP-vermittelte Aufnahme via Makropinozytose kann Dosisabhängig inhibiert werden. (A)

Differenzierte primäre Makrophagen wurden 1h mit dem PI3K-Inhibitor präinkubiert, bevor sie in Triplikaten mit den dargestellten Vektoren transduziert wurden. 8h später erfolgte ein Mediumwechsel und 72h später die Zellyse. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität bestimmt wie oben beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (B) Differenzierte primäre Makrophagen wurden 1h mit dem Na⁺/H⁺-Austauscher EIPA in der angezeigten Konzentration präinkubiert, bevor sie in Triplikaten mit den dargestellten Vektoren transduziert wurden. Anschließend wurde verfahren wie oben beschrieben. Dargestellt ist der prozentuale Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler (SEM) wieder.

Abbildung S4: NPC1 wird spezifisch herunter reguliert. HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA und NPC1-siRNA transfiziert. 24h später wurden die Zellen gegen NPC1 spezifisch gefärbt und anschließend mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper behandelt. Die Messung erfolgte mithilfe eines Durchflusszytometers. Dargestellt ist der Durchschnitt aus drei Messungen, Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler (SEM) wieder.



(A)



(B)

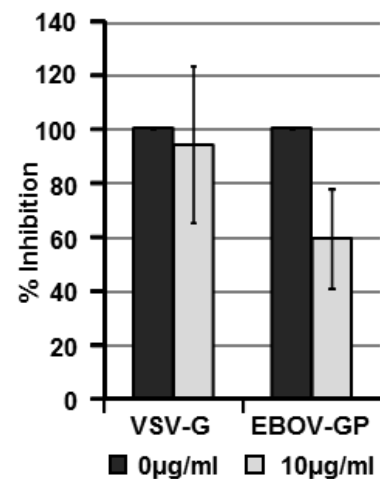
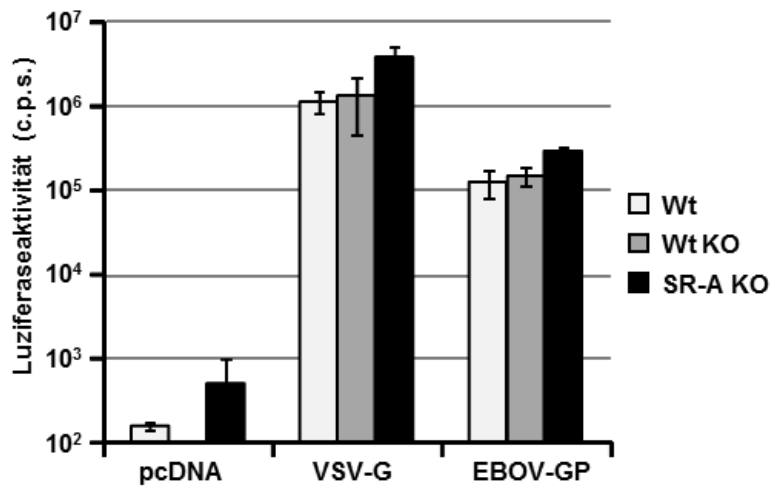


Abbildung S5: Die transiente Expression von SR-A Isoformen erhöht nicht die GP-vermittelte Transduktion, während ein SR-A Inhibitor die Transduktion vermindert. (A) 293T Zellen wurden wie unter S1 beschrieben mit den dargestellten Rezeptorkandidaten transfiziert und 24h später mit GP-tragenden Vektoren transduziert. Anschließend wurde verfahren wie oben beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Standardabweichungen. (B) Differenzierte Makrophagen wurden 1h in der angegebenen Konzentration mit dem SR-A Inhibitor Fucoidan präinkubiert, bevor eine Transduktion mit lentiviralen Vektoren folgte. Dargestellt ist der Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler (SEM) wieder.

(A)



(B)

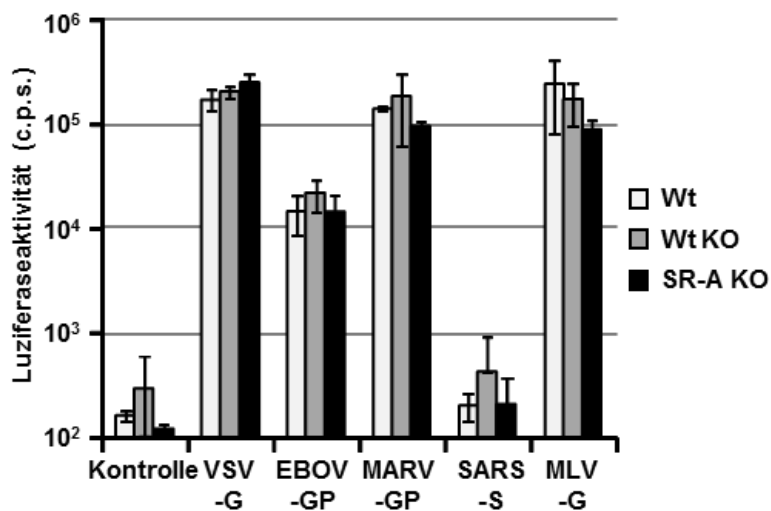


Abbildung S6: SR-A knockout führt nicht zu einer verminderten Transduktion muriner Makrophagen. (A)

Lungenmakrophagen von je zwei Mäusen (Wt: Wildtypmäuse, Wt KO: Wildtyp mit unrelevantem *knockout*, SR-A KO: SR-A *knockout*) wurden vereint und 12h nach der Isolation mit den dargestellten lentiviralen Vektoren in Triplikaten transduziert. Anschließend folgte die Luciferasemessung wie oben beschrieben. (B) Mausmakrophagen wurden aus Knochenmark für 10Tage differenziert. Die Transduktion erfolgte in Triplikaten mit den dargestellten Vektoren, anschließend wurde verfahren wie oben beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Standardabweichungen.

9 Zusammenfassung

Franziska Dahlmann (2014)

Analyse des Eintritts von Ebolaviren in Makrophagen

Das Ebola hämorrhagische Fieber (EHF) ist eine zoonotische Erkrankung, die mit fatalen Verläufen in Menschen und Primaten einhergeht. Ursächlich sind Viren des Genus Ebolavirus aus der Familie Filoviridae - membranumhüllte RNA-Viren, die aufgrund ihrer extremen Virulenz nur in Laboratorien der höchsten Sicherheitsstufe, S4, untersucht werden können. Gegenwärtig stehen weder Impfstoffe noch Therapeutika zur Verfügung, die vor EHF schützen. Für die Entwicklung antiviraler Ansätze ist ein genaues Verständnis der Virus-Wirtszellinteraktionen wichtig. Das virale Glykoprotein (GP) vermittelt den ersten Schritt im Ebolavirus- Vermehrungszyklus, den Virus-Eintritt in Zielzellen. In den letzten Jahren wurden mehrere zellulären Faktoren beschrieben, die den Eintritt von Ebolaviren in Zelllinien fördern: Lektine, Proteine der TIM-Familie, TAM Rezeptor-Tyrosinkinasen (Axl, Mer, Tyro3) sowie der Cholesteroltransporter NPC1. Dabei ist bemerkenswert, dass sowohl TIM-Proteine als auch TAM Rezeptor-Tyrosinkinasen an der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt sind und es Hinweise darauf gibt, dass das Ebolavirus den zugrundeliegenden Mechanismus für seine Aufnahme in Zelllinien nutzt. Welche zellulären Faktoren und Prozesse den Eintritt in Makrophagen fördern, die die wichtigsten Zielzellen des Ebolavirus darstellen, ist dagegen weitgehend unklar und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Mit Hilfe von lentiviralen Vektoren, die das Ebolavirus Glykoprotein (GP) auf ihrer Oberfläche tragen, konnte gezeigt werden, dass Mannose-spezifische Lektine sowie TIM-1 den GP-vermittelten Eintritt in transfizierte Zelllinien deutlich steigern können. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass endogen exprimiertes Axl und TIM-1 den GP-getriebenen Eintritt in einer zelltypabhängigen Weise steigern. Expressionsanalysen sowie Experimente mit siRNAs und anderen Inhibitoren demonstrierten jedoch, dass diese Faktoren für den GP-vermittelte Eintritt in Makrophagen nicht wichtig sind. Im Gegensatz dazu war die Expression von NPC1 für den effizienten GP-getriebenen Eintritt in Zelllinien und Makrophagen essentiell.

TIM-1 und Axl sind für die Phagozytose von apoptotischen Zellen wichtig. Daher wurde untersucht, ob Faktoren die auf Makrophagen exprimiert werden und an der Erkennung und Aufnahme von apoptotischen Zellen beteiligt sind, durch das Ebolavirus für den Zelleintritt verwendet werden. Der Einsatz von siRNAs und anderen Inhibitoren zeigte, dass Mer, Integrin α_V und *scavenger receptor* A (SR-A) für die GP-getriebene Infektion von Makrophagen wichtig sind, allerdings konnte eine unspezifische Wirkung der gegen SR-A gerichteten siRNA nicht ausgeschlossen werden. Schließlich konnte demonstriert werden, dass siRNAs gegen SR-A, Mer, Integrin α_V und NPC1 die Infektion von Makrophagen durch vermehrungsfähiges Ebolavirus reduzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Ebolavirus mehrere Wirtszellproteine für den Eintritt in Makrophagen nutzt, die für die Aufnahme apoptotischer Zellen wichtig sind. Weitere Studien müssen zeigen, ob diese Faktoren Ansatzpunkte für die antivirale Intervention darstellen.

10 Summary

Franziska Dahlmann (2014)

Analysis of ebolavirus entry into macrophages

Ebola hemorrhagic fever is a zoonotic viral disease, which is associated with high case fatality rates in humans and primates. The causative agents, ebolaviruses, are enveloped RNA viruses which belong to the family filoviridae and, because of their extreme virulence, require handling under biosafety level 4 conditions. At present, neither vaccines nor therapeutics are available to protect against infection by ebolaviruses. For development of antiviral strategies, it is necessary to elucidate virus-host cell interactions. The viral glycoprotein (GP) mediates the first step in the viral replication cycle, the infectious entry into host cells. Recently, several cellular factors have been found to promote the entry of ebolaviruses into cell lines: Lectins, TIM proteins, TAM (Tyro3, Axl, Mer) receptor tyrosine kinases and the cholesterol transporter NPC1. Interestingly, both TIM family members and TAM receptor tyrosine kinases are involved in the phagocytosis of apoptotic cells, indicating that ebolaviruses might exploit cellular processes involved in the clearance of apoptotic cells to enter host cells. However, the cellular entry of ebolaviruses has so far mainly been studied with cell lines and it is largely unknown how ebolaviruses enter macrophages, which constitute the major viral target cells. Therefore, the aim of the present study was to identify host cell factors which promote entry of ebolaviruses into macrophages.

For analysis of ebolavirus entry, lentiviral pseudotypes bearing the Zaire ebolavirus glycoprotein (EBOV-GP) were employed. Several mannose-specific lectins and TIM-1 were shown to promote entry into transfected cells. Furthermore, expression of endogenous Axl and TIM-1 was demonstrated to promote GP-driven entry in a cell-line dependent manner. However, expression studies combined with inhibition analyses demonstrated that neither mannose-specific lectins nor TIM-1 or Axl contribute to GP-mediated entry into macrophages. In contrast, NPC1 expression was essential for efficient GP-mediated entry into cell lines and macrophages. TIM-1

and Axl are important for recognition of apoptotic cells. Therefore, it was determined whether other factors involved in recognition of apoptotic cells by macrophages might be required for GP-dependent entry into this cell type. Inhibition studies with siRNAs and other inhibitors revealed that Mer, integrin α_V and scavenger receptor A (SR-A) contribute to GP-mediated entry into macrophages, although unspecific effects of the SR-A siRNA could not be excluded. Finally, it was demonstrated that siRNAs against SR-A, Mer, integrin α_V and NPC1 reduced macrophage infection by replication competent Zaire ebolavirus. These results show that ebolaviruses engage multiple host cell proteins for entry into macrophages, which are involved in the phagocytosis of apoptotic cells. Further studies are required to analyze whether these factors represent targets for antiviral intervention.

11 Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Stefan Pöhlmann – danke, dass du das Experiment gewagt hast, eine Tierärztin einzustellen. Nach wie vor kann ich mich für mein Projekt begeistern – danke für alle Möglichkeiten, die du mir eröffnet hast!

Mein großer Dank gilt auch Prof. Georg Herrler. Auch Sie haben ein Experiment gewagt – mit einer externen Doktorandin – danke, dass Sie mir eine Promotion an der TiHo auf unkomplizierte Art und Weise überhaupt ermöglicht haben.

Danke, Heike! Du hattest sicherlich die meiste Arbeit mit mir – danke für deine Bemühungen, unermüdlichen Korrekturen und Ideen sowie deren Umsetzung. Ich werde mich immer wieder gerne an unsere traute Zweisamkeit im Labor zurück erinnern☺. Danke auch an das restliche Labor 3.13! Astrid und Regine: es war großartig mit euch – einfach eine Wellen-(Pferde)Länge! Danke für eure Unterstützung und Gradlinigkeit☺. Danke, Steffi und Adeline, für eine gute Teamarbeit und einen (fast) gemeisterten gemeinsamen Leidensweg ;).

Danke Kathrin, dass du so unkompliziert und hilfsbereit bist! Ich konnte mit jedem Problemchen zu dir kommen (Dienstreiseanträge :D) und du hast es einfach gelöst!!

Bedanken möchte ich mich auch bei der restlichen Pöhlmann-Crew – ich hoffe, dass wir weiterhin so fröhliche Kneipenabende verbringen. Danke an dieser Stelle vor allem an Flo, für die unermüdliche Erheiterung und Organisation in Freizeitfragen ;). Danke auch Tina für unzählige gemeinsame Bahnfahrten – vor allem nach Weihnachtsfeiern :D!

Danke natürlich auch an alle, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben! Danke nach Marburg an Nadine Biedenkopf für eine super Kooperation mit den Ebolavirus-Experimenten und an Prof. Stefan Becker, der diese erst ermöglicht hat. Danke nach Aachen an Anne Babler und Andrea Büscher – es hat so viel Spaß gemacht, mit euch zusammen zu arbeiten und in dem Sinne auch danke an Prof. Willi Jahn-Dechent! Danke an die Transfusionsmedizin der UMG Göttingen: hier gilt mein Dank vor allem den Damen an der Ausgabe der Blutbank. Danke an Frau Munk und Herrn

Verkennis sowie Frau Dr. Kimmina an der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der UMG Göttingen. Danke an alle, die uns Material zur Verfügung gestellt haben!

Danke an meine lieben Studienfreunden für eine wundervolle Zeit, die wir nie wieder so miteinander verbringen können, unvergesslich! Danke an alle Freunde, die so wunderbar ablenken können und mit denen ich ein großartiges Fest bereits im letzten Jahr gefeiert habe – weiter so!! Entschuldigt, dass ich euch nicht namentlich erwähne, aber ihr wisst ja, wer gemeint ist ;)!

Danke, Familie. Ihr seid einfach super, mit allen Ecken und Kanten. Danke für eure Unterstützung und Aufmunterung. Danke vor allem meinen verrückten Geschwistern, Swani, Kathi, Max und Lukas, von denen meist einer schlechte Laune hat aber trotzdem keine schlechte Stimmung aufkommt ☺. Danke meinen Omas, die immer mitgefiebert haben. Danke an meine Eltern - einfach für alles! Mama, du weißt am besten, was du alles für uns getan hast, danke, dass du für uns da bist. Papa, auch wenn du mir damals gesagt hast „studier es nicht“ – jetzt trete ich doch ein bisschen in deine Fußstapfen, auch wenn sie mir immer zu groß sein werden. Und schlussendlich: Danke DOM. Zwei sind besser als einer allein, denn wenn sie hinfallen, richtet einer den anderen auf. Danke, mein Fels in der Brandung.