

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
доцент Олексій Юрійович Нипорко  
Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри  
від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р

**ІМУНОГЛОБУЛІНИ М ЛЮДИНИ ІНГІБУЮТЬ  
ІНТЕРНАЛІЗАЦІЮ КОРОНАВІРУСУ TGEV В КУЛЬТУРІ КЛІТИН  
LLC-PK1**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студента спеціальності

091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

**Гарана Богдана Євгенійовича**

Науковий керівник від кафедри

к.б.н, **Самофалова Дарія Олексіївна**

Робота виконана у НДІ “МедЛайф” під керівництвом професора, д.б.н. **Петра Васильовича Погрібного**

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2022 р.

## АНОТАЦІЯ

Гаран Б.Є. Імуноглобуліни М людини інгібують інтерналізацію коронавірусу TGEV в культурі клітин LLC-PK1. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра спеціальності 091 Біологія ОП “Молекулярна біотехнологія”.

У роботі досліджено ефективність запобігання інтерналізації коронавірусу у тваринні клітини сумарними препаратами імуноглобулінів М, виділеними із пуповинної крові новонароджених та венозної крові породіль. Випробувано та застосовано оригінальну модель вірус-клітинної взаємодії, що дозволяє точно оцінювати ефективність інгібіторів інтерналізації вірусів.

Встановлено, що випробувані препарати можуть бути потенційними противірусними засобами, що майже не втручаються у роботу рецептора епідермального фактору росту у клітинах культури LLC-PK1. Сумарні препарати імуноглобулінів М новонароджених мають кращі противірусні властивості.

Отримані результати допомагають покращити розуміння процесів та ролі імуноглобулінів М при інфікуванні клітин еукаріот вірусами. В подальшому отриману інформацію можна буде застосувати для розробки безпечних та ефективних засобів запобігання потраплянню вірусів всередину клітини, зокрема й вірусів з підвищеною частотою мутаційних процесів. Імуноглобуліни М людини можуть мати низку переваг перед іншими засобами. Результати цієї роботи можуть прискорити розвиток ефективних стратегій запобігання вірусних інфекцій, розробку універсальних противірусних засобів.

**Ключові слова:** коронавірус; імуноглобуліни М; вірус трансмісивного гастроентериту; рецептор епідермального фактору росту; інгібування інтерналізації.

**ЗМІСТ**

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Рецептор епідермального фактору росту	9
1.2 Димеризація та ендоцитоз рецептора епідермального фактору росту	11
1.3 Інтерналізація вірусів за допомогою рецептора епідермального фактору росту	14
1.4 Роль антитіл у боротьбі з вірусною інфекцією	18
1.5 Імуноглобуліни М у боротьбі з вірусами	22
1.6 Вірус трансмісивного гастроентериту	23
1.7 Клітинна лінія LLC-PK1	24
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	25
2.1 Отримання рекомбінантного епідермального фактору росту	25
2.1.1 Напрацювання рекомбінантного білку в культурі клітин з надекспресією епідермального фактору росту	25
2.1.2 Очищення рекомбінантного епідермального фактору росту	25
2.2 Культура LLC-PK1	26
2.3 Вірус трансмісивного гастроентериту	27
2.4 Отримання сумарних імуноглобулінів М із сироватки венозної крові матерів та пуповинної крові новонароджених	27
2.4.1 Отримання та підготовка зразків сироваток	27
2.4.2 Очистка імуноглобулінів М	28
2.5 Визначення середньої інфекційної дози вірусу трансмісивного гастроентериту для культури LLC-PK1	29
2.6 Визначення цитотоксичної дії сумарних імуноглобулінів М людини для культури LLC-PK1	29

	4
2.7 Оцінювання впливу препаратів на репродукцію вірусу трансмісивного гастроентериту	29
2.8 Вестерн блот аналіз	30
2.8.1 Перевірка сигналу активації рецептора епідермального фактору росту у клітинах LLC-PK1	30
2.8.2 Дослідження ефективності інгібування інтерналізації вірусів імуноглобулінами М	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	32
3.1 Результати визначення середньої інфекційної дози вірусу трансмісивного гастроентериту для культури LLC-PK1	32
3.2 Результати визначення цитотоксичної дії сумарних імуноглобулінів М людини для культури LLC-PK1	33
3.3 Оцінка впливу препаратів на репродукцію вірусу трансмісивного гастроентериту	33
3.4 Перевірка активації рецептора рекомбінантним та мишачим епідермальним фактором росту	35
3.5 Фосфорилування рецептора епідермального фактору росту у відповідь на інкубацію з різними сполуками. Інгібування інтерналізації вірусу	36
3.6 Статистична обробка сигналів фосфорилування рецептора епідермального фактору росту	37
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40

## ВСТУП

Віруси є облігатними внутрішньоклітинними паразитами. Завдяки різноманітним механізмам взаємодії із клітинами господаря та високій мутаційній мінливості ці патогени є причиною невиліковних хвороб та епідемій. Питання подолання вірусної інфекції є актуальним через низку факторів, які ускладнюють розробку ефективної противірусної терапії.

Сучасні противірусні препарати, що запобігають потраплянню вірусів всередину клітини, повинні зберігати ефективність відносно вірусів, що мутували, бути безпечними для організму господаря та універсальними. Викликом перед розробниками таких лікарських засобів є застосування вірусами механізмів, що ускладнюють розпізнавання віріонів антитілами [1]. Інша стратегія вірусів – пряма міжклітинна передача, що обмежує доступ лікарських засобів до віріонів [2].

Яскравим прикладом неспроможності сучасних дослідницьких лабораторій запобігти вірусним епідеміям є події 2019 року, пов'язані з появою SARS-CoV-2. Від багатьох вірусних хвороб і досі не винайдене ефективне лікування. Пошук універсальних та ефективних інгібіторів інтерналізації, які були б готові до застосування до розробки та налагодження промислового випуску вакцини, на сьогодні є одним з основних напрямків роботи наукової спільноти.

Швидкий прогрес досліджень методів проникнення вірусу обіцяє нові підходи, які могли б випередити мутаційну активність вірусу. Проте, розроблено напроцуд мало лікарських засобів або протоколів лікування в клінічному використанні на основі прогнозів, зроблених за структурними моделями.

Одним з напрямків досліджень, які могли б прискорити прихід інгібіторів у клініки, є розробка сполук, що унеможливають проникнення вірусу шляхом взаємодії із необхідними для інтерналізації білковими структурами рецепторів. Наприклад, нещодавно було виявлено невелику

молекулу BMS-378806, яка запобігає проникненню віріонів HIV-1 шляхом конкуренції з CD4 рецептором, що зв'язує gp120а та є “воротами” для вірусу [3]. Проблемою цього підходу є часте виникнення небажаних ефектів в клітинах господаря на кшталт неконтрольованого ділення, апоптозу або диференціації, що виникають внаслідок спрямованого введення лігандів до таких рецепторів.

Розробка мультивалентних інгібіторів – сполук, що зв'язуються з декількома епітопами одного (або різних) білків на вірусній поверхні, можуть подолати проблеми, викликані мутацією вірусних білків. Прикладами мультивалентних інгібіторів є розчинні рецептори грипу та HIV-1, які є потужними запобіжниками проникнення *in vitro* та, певною мірою, *in vivo* [2]. Вдосконалення сучасних методів моделювання вірус-рецепторної взаємодії на основі структури шляхом розрахунку характеристик білків та динаміки зв'язування з лігандами, а також методів скринінгу інгібіторів, безумовно, допоможе розширити діапазон засобів, які можуть бути протестовані, та збільшить швидкість їх ідентифікації [4, 5]. Розробка таких лікарських засобів потребує ретельного та кропіткого вивчення вірусів, що може потребувати багато часу та зусиль.

Перспективним напрямом досліджень, направлених на запобігання вірусних інфекцій, є використання при лікуванні антитіл, що впливають на інгібування інтерналізації віріонів всередину клітини, полегшують фагоцитоз, стимулюють імуногенність та слугують медіаторами імуноної відповіді. Фрагменти імуноглобулінів, що зв'язують антигени (FAb), мають майже необмежені можливості розпізнавання екзогенних епітопів.

Одним із об'єктів у вищезазначеному напрямі досліджень виступають природні антитіла. Натуральні антитіла людини відіграють важливу роль, запобігаючи поширенню патогенів на життєво важливі органи, а також підвищуючи імуногенність шляхом посилення перехоплення антигенів у органах лімфатичної системи. Природні антитіла виробляються без попереднього інфікування, вакцинації, впливу інших екзогенних антигенів

або пасивної імунізації. Ці антитіла можуть активувати класичний шлях комплементу, що веде до лізису віріону задовго до того, як активується адаптивна імунна відповідь.

Імуноглобуліни М (IgM) мають ряд переваг, порівняно з іншими типами імуноглобулінів. Також вони є найконсервативнішими з імуноглобулінів, досить чисельними та найтяжчими у дослідженні [6]. Пули IgM у крові новонародженої та дорослої людини суттєво відрізняються кількістю природних антитіл, синтезованих наївними В-клітинами. Імуноглобуліни М не здатні подолати гематоплацентарний бар'єр, тому IgM у пуповинній крові – продукт виключно пренатальних наївних В-клітин, що починають вироблятися з 20 тижня вагітності та не активувалися патогенами [7]. У той самий час в організмі породіллі присутні як природні антитіла, так і специфічні – вироблені у відповідь на попередні інфекції. Такі відмінності дають можливість дослідити різницю впливу сумарних препаратів суто природних та суміші природних із специфічними IgM на інтерналізацію вірусів.

Ідентифікація багатьох клітинних рецепторів людини є надзвичайно важливим внеском у наше розуміння вірусного тропізму та патогенезу. Дослідження різних і несподіваних способів, якими вірусні білки можуть взаємодіяти з клітинними рецепторами, може відкрити нові можливості для запобігання епідемії та лікування давніх хвороб, що супроводжують людство.

Одним з перспективних об'єктів дослідження є рецептор епідермального фактору росту (EGFR). У наступних розділах буде розглянута роль EGFR в інтерналізації та розмноженні вірусів родин *Coronaviridae*, *Parvoviridae*, *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae* та інших.

Метою даної роботи є порівняння ефективності інгібування проникнення вірусу сумарними препаратами IgM, виділених із сироваток пуповинної крові новонароджених та венозної крові породіль при додаванні до культур LLC-PK1

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання: розробити модель взаємодії вірусу та клітини з можливістю дослідження впливу речовин (IgM) як потенційних засобів профілактики та лікування вірусної інфекції; визначити цитотоксичність досліджуваних препаратів для клітин.

Методи біологічних досліджень, що використовувалися для роботи, включають афінну та ексклюзійну хроматографію, гель-електрофорез, вестерн блот, кількісний аналіз та обробку зображень вестерн-блоту і гель-електрофорезу у програмному забезпеченні, виділення та очистку рекомбінантних білків, роботу із культурами клітин, спектрофотометричні методи.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Рецептор епідермального фактору росту

Рецептори епідермального фактору росту – родина трансмембранних глікопротеїнів з тирозинкіназною активністю, що регулює клітинні гомеостатичні процеси. Наразі виявлено 7 високоафінних лігандів: епідермальний фактор росту (EGF), трансформуючий фактор росту  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), гепарин-зв'язуючий EGF (HB-EGF), амфірегулін, епірегулін, бетацелюлін, нейрегуліни [8-10]. Фосфорильований тирозинкіназний рецептор (RTK) взаємодіє із доменами Src гомології 2 (SH2 domain) – найпоширенішими доменами розпізнавання фосфотирозину (120 має людський геном) [11]. Зв'язування EGFR (ErbB-1) з епідермальним фактором росту (EGF) призводить до каскаду швидких подій, таких як автофосфорилування, зміна мембранного потенціалу, активація сигнального шляху фосфоінозитид-3-кінази (PI3K), мітоген-кінази (MAPK), JAK/STAT шляхів [12-14]. У клітині відбувається синтез білків, зміна у будові цитоскелету, інгібування апоптозу та інші процеси (Рис. 1.1). На противагу, приєднання 2,3,5-Tris-(glutathion-S-yl)hydroquinone (TGHQ) також викликає автофосфорилування EGFR по амінокислотним залишках тирозину, проте спричиняє апоптоз клітини [15].

Така різниця можлива завдяки наявності декількох позаклітинних доменів приєднання та амінокислотних залишків тирозину всередині клітини, що фосфорилуються залежно від ліганда. Якщо pY1068, pY1148, та pY1173 є обов'язковими для інтерналізації рецептора, то pY845, pY1148, pY1086, pY1101 взаємодіють із білками-регуляторами сигнальних ланцюжків [16-21]. Виходячи з результатів дослідження Dong (Рис. 1.2), TGHQ- або EGF-активовані EGFR мають різні комбінації фосфорилування по тирозину та залучають різні сигнальні білки до EGFR, що й визначає відмінності в



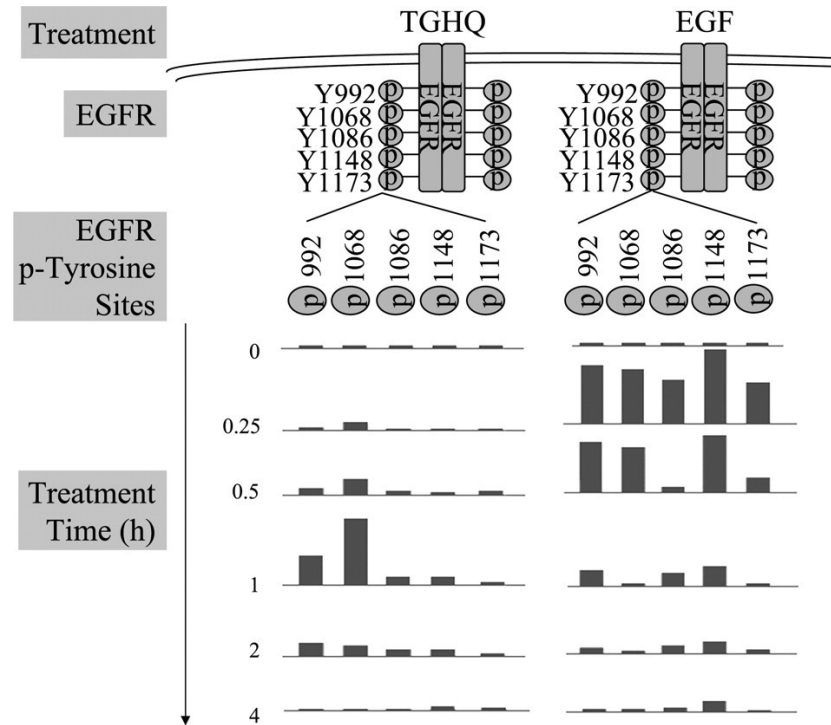


Рис. 1.2 – Порівняння деяких сайтів фосфорилування EGFR по амінокислотним залишкам тирозину після інкубації TGHQ (200 μM) та EGF (50 ng/ml)

## 1.2 Димеризація та ендоцитоз рецептора епідермального фактору росту

Зв'язування лігандів з EGFR відбувається в межах позаклітинної області, яка ділиться на чотири домени, I-IV [23]. Приєднання EGF до EGFR спричиняє димеризацію рецепторів, що викликає зближення двох внутрішньоклітинних тирозинкіназних доменів достатньо близько для автофосфорилування і тим самим активізує тирозинкінази. Димерна 2:2 структура EGF•EGFR демонструє рецепторну, а не ліганд-опосередковану димеризацію, в якій дві молекули EGFR безпосередньо зв'язані між собою

позаклітинними доменами II (Рис. 1.3). Той самий режим димеризації справедливий для структури 2:2 комплексу TGF- $\alpha$ •EGFR навіть попри здатність TGF- $\alpha$  утворювати димери між собою [24, 25].

Рецептор EGF володіє унікальним механізмом активації. Кожен ліганд контактує лише з одним рецептором та приєднанням значно змінює його конформацію: вивільняє “руку” димеризації в домені II [26, 27]. Перед зв'язуванням ліганда ця “рука” повністю прихована взаємодіями з доменом IV (Рис. 1.3) [27-29].

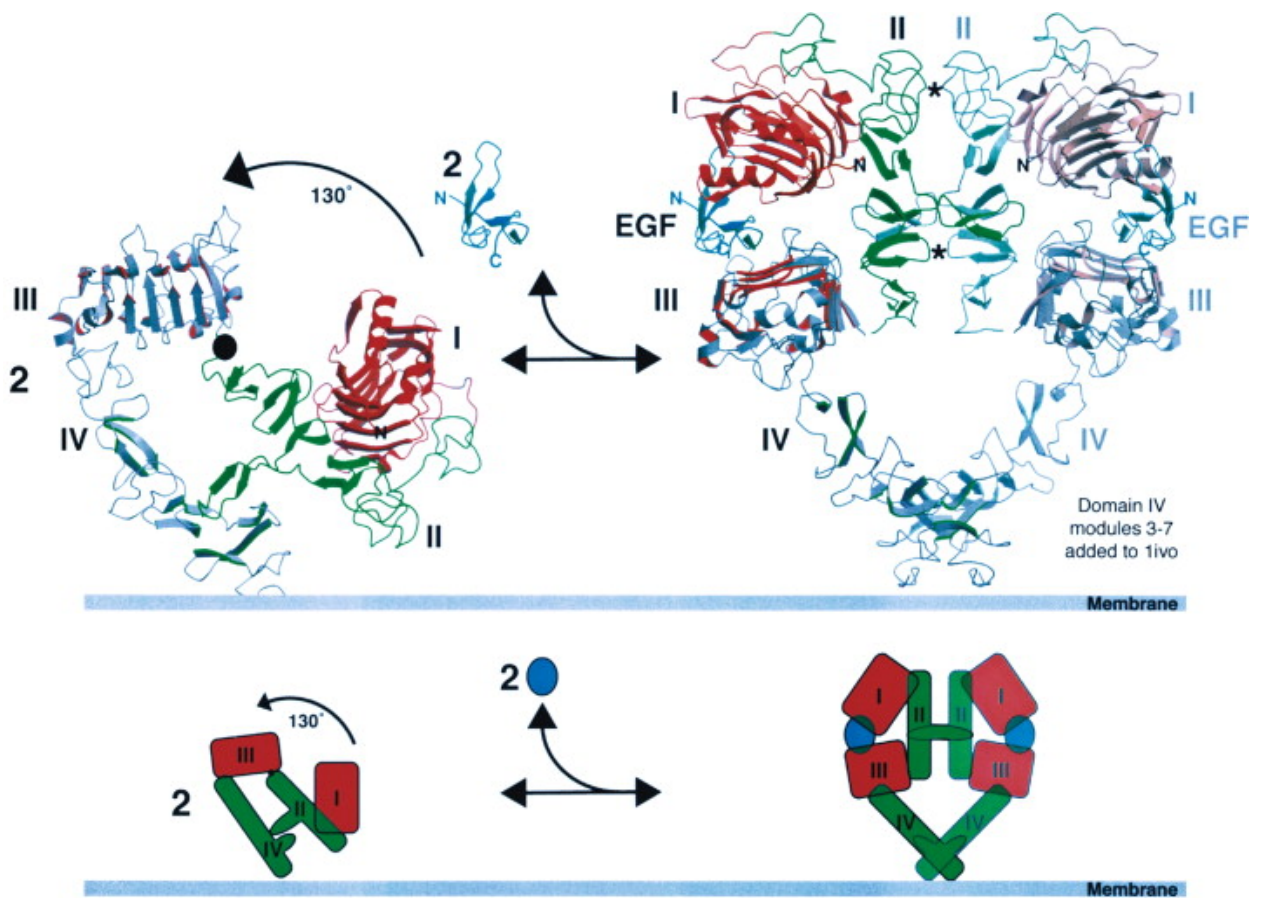


Рис. 1.3 – Модель димеризації EGFR

Компартменталізація є основним механізмом, який контролює ротацію у мережі EGFR (Рис. 1.4) [30]. За допомогою неї система набуває надійності та певних небажаних характеристик. Для сортування активних молекул ERbB-1 відбувається F-актин-залежний ендоцитоз та багатоетапна лізосомна

переробка або убіквітинізація рецепторів [31-33]. Саме тому у багатьох клітинах EGFR можна виявити у багатих на холестерин кавеолах [34]. Результат сортування залежить від фосфорилування рY1045, який взаємодіє із убіквітин-лігазою E3 (Cbl). Якщо убіквітинізації не відбувається, рецептор продовжує виконувати свою функцію на мембрані [32].

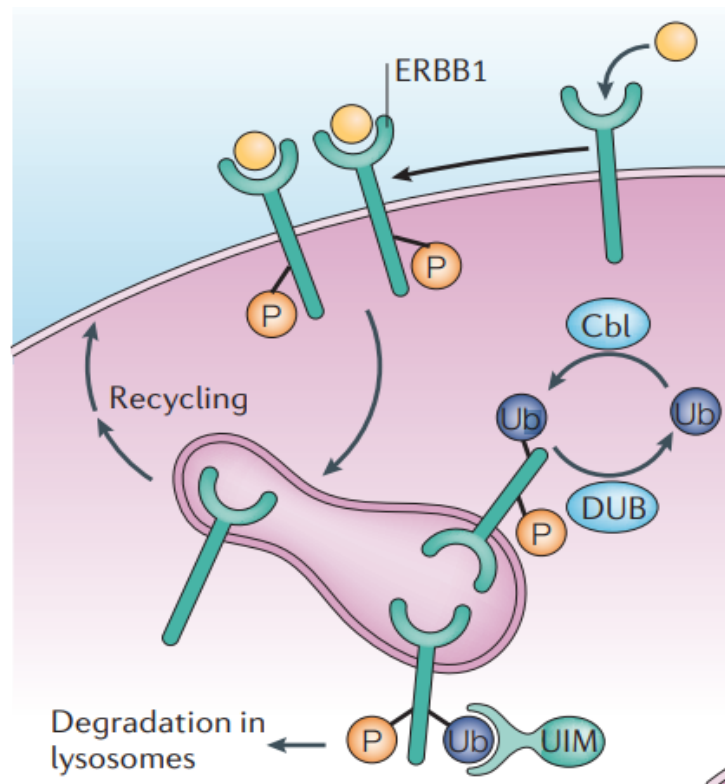


Рис. 1.4 – Компарментизація та деградація EGFR

Рецептори EGF ErbB-1, ErbB-2 та ErbB-4 – єдині відомі RTK, які не вимагають початкового фосфорилування кінази для повної каталітичної компетентності [29]. Із дослідження електронної щільності нестабільних Asp<sup>960</sup> і 13 залишків, що слідує за His<sup>964</sup>, можна припустити, що саме ця ділянка причетна до незалежного від приєднання високоафінного ліганда ендоцитозу EGFR [29, 34, 35]. Активація протеїнкінази С (PKC) також знижує поріг афінності EGFR до його лігандів, гальмує регуляторну активність RTK та полегшує інтерналізацію рецептора. Це є запобіжником неконтрольованого

впливу лігандів, адже під впливом РКС EGFR стає “функціонально невидимим” [34]. Ці унікальні властивості частково пояснюють, чому рецептори сімейства EGFR часто спричиняють малігнізацію клітин та широко використовуються вірусами для інтерналізації.

### **1.3 Інтерналізація вірусів за допомогою рецептора епідермального фактору росту**

Віруси є облігатними внутрішньоклітинними паразитами і для реплікації обов'язково мають подолати мембранний бар'єр. Для цього ними мають бути розвинуті стратегії використання сигнальних шляхів клітин господаря через взаємодію із мембраною та її рецепторами. Було помічено, що деякі вірусні хвороби часто асоціюються із неконтрольованою проліферацією. Зокрема, вірус фіброми Шоупа (SFV) є причиною фібром та фібросарком у новонароджених кроликів, вірус пухлини Яба (YTV) – підшкірних гістіоцитом у людини [38]. Kato et al припустили, що клітини, заражені SFV, секретують “фактори, що стимулюють ріст”, що і спричиняє неконтрольований ріст оточуючих фібробластів [39]. Ця гіпотеза частково підтвердилася при секвенуванні геному вірусу коров'ячої віспи (VACV). Blomquist et al виявили ген 19K, що кодував 19 кДа білок із значною схожістю з EGF і TGF [40]. Згодом виявилось, що ці вірусні білки справді є функціональними лігандами EGFR (Таблиця 1.1) [38].

Віруси тварин охоплюють багато вірусних родин, кожна з яких має різну морфологію віріонів, структуру геному та життєвий цикл. Незважаючи на великі відмінності, прості та складні віруси для розмноження мають приєднатися до поверхневих рецепторів клітини і реплікуватися в цитоплазмі. Основна розбіжність полягає у механізмі інтерналізації, що поділяють на два типи: ендцитозний та неендцитозний.

Virus (strain)	Name	Amino acids	% homology
Vaccinia (Copenhagen)	VGF	142	100
Vaccinia (WR)	VGF	140	99
Cowpox (GRI-90)	CGF	138	99
Variola (Bangladesh)	VaGF	140	97
Myxoma (Lausanne)	MGF	85	42
Shope fibroma (Kasza)	SFGF	80	44

Таблиця 1.1 – Ступінь гомології між білками, кодованими геном 19К у вірусів родини Poxviridae та функціональним доменом білків родини EGF/TGF

Складні віруси найчастіше використовують клатрин-опосередкований ендоцитоз, піноцитоз або кавеоли, локальну полімеризацію актину та залучення динаміну [41, 42]. Кінетика і ефективність проникнення сильно варіюються між вірусами з різних родин, всередині родів та між штамми одного виду [1]. Незважаючи на це, для безпосереднього подолання мембранного бар'єру або злиття мембран (Рис. 1.5 (II)) необхідна більша енергія, ніж та, що виникає під час вірус-рецепторної взаємодії [43]. Для такого типу інтерналізації необхідна одночасна взаємодія з 5-6 олігомерними рецепторами та зближення мембран на відстань менше 1 нм [44-46]. Очевидно, що потрібні додаткові допоміжні або альтернативні механізми для вдалого проникнення.

Багато вірусів використовують описаний раніше ендоцитоз EGFR та його сигнальні шляхи для проникнення, реплікації та пригнічення противірусної системи господаря (Рис. 1.5 (I)) [9, 37, 47].

Наочним прикладом такої взаємодії є інтерналізація цитомегаловірусу людини (HCMV). При інфікуванні глікопротеїни HCMV gB і gH зв'язуються з

EGFR та інтегрином  $\alpha\beta 3$  [47, 48]. Вірус, попередньо інкубований  $\alpha\beta 3$ , втратив 77% своєї вірулентності, а блокування EGFR інгібувало інтерналізацію на 97% [47]. Це свідчить, що для проникнення вірус має одночасно взаємодіяти з обома білками.

Активація EGFR вірусом грипу А (IAV) регулює експресію нуклеопротейнів та пригнічує противірусний імунітет через домени SH2. Блокування передачі сигналу від IAV-активованого EGFR до регуляторних сигнальних шляхів шляхом інгібування або нокауту SH2 повертає адекватну реакцію клітини на патоген та підвищує експресію IFN типу I та III [49].

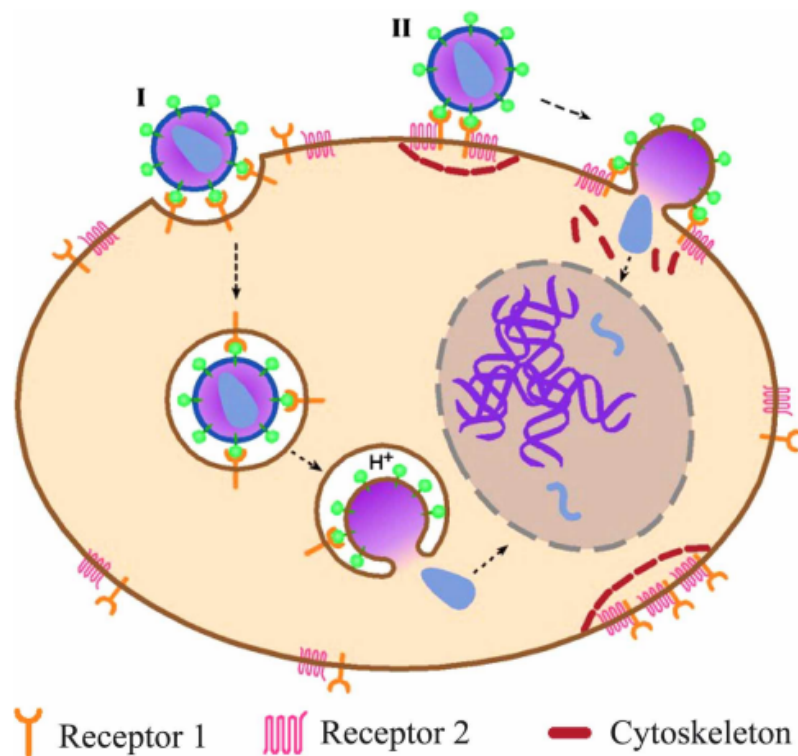


Рис. 1.5 – Проникнення віруса до клітини шляхом рецептор-опосередкованої інтерналізації (I) та злиття мембран (II)

Доведено, що зараження вірусом Епштейн-Барр (EBV) підвищує шанси виникнення лімфоми Беркітта, раку носоглотки та інших онкозахворювань [50, 51]. Аналіз експресії генів EBV з біопсій вказує, що до малігнізації причетні гени EBNA1, LMP1 та LMP2 [52, 53]. Пізніше була виявлена чітка

кореляція між підвищеним ступенем експресії EGFR та LMP1 [54].  
Порушення у регуляції системи EGFR і є причиною онкогенності EBV.  
Результати досліджень Wang et al свідчать, що EGFR є корецептором,  
необхідним для інтерналізації EBV [55].

Ще один приклад використання аденоасоційованим вірусом 6 (AAV6)  
EGFR як корецептора відкриває нові перспективи для медицини та науки  
[56]. Цей вірус не викликає патологій у господаря та може застосовуватися  
для лікування названих вище онкологічних захворювань, пов'язаних з  
порушенням регуляції EGFR.

Рецептори EGF та ефріну A2 (EphA2) є важливими корецепторами для  
інтерналізації та зараження вірусом гепатиту С (HCV), хоча EGFR  
безпосередньо не взаємодіє з його віріоном. Активація сигнальних шляхів,  
залежних від EGFR, призводить до формування CD81-CLDN1 комплексів,  
необхідних для проникнення HCV в клітину [57]. Недавні дослідження  
доводять, що імунна система людини не контролює зараження HCV [58].  
Вірус гепатиту В – це ssРНК вірус, що передбачає роль Toll-подібних  
рецепторів (TLRs) 7 і 8 в ініціювання антивірусної реакції. Аналіз секретому  
антиген-презентуючих клітин після зараження HCV свідчить, що антивірусна  
реакція спрацьовує неадекватно. Зокрема, у макрофагах TLR7 та TLR8 не  
індукували експресію генів IFN- $\beta$  та не інгібували реплікацію вірусу [58].  
Ендосомні рецептори TLR3, TLR7 та TLR8 в нормі активують імунну  
відповідь на ендогенні РНК. Доведено, що TLR3 це єдиний з TLRs, що  
потребує фосфорилування двох тирозинових залишків для передачі сигналу.  
Функцію фосфорилування безпосередньо виконує EGF RTK [59]. Складнішу  
систему сигналізації мають TLR7 та TLR8, що закінчується зокрема  
індукцією IFN- $\beta$ , та вона так само залежить від регуляції EGFR.

З наведених прикладів взаємодії вірусів з EGFR зрозуміло, що при  
виборі стратегії запобігання інфікуванню та його лікування варто уникати  
безпосереднього впливу лікарського засобу на рецептор. Оскільки саме EGFR  
є медіатором імунної відповіді та інтерналізації, його контакт з вірусом також

має бути виключеним.

#### **1.4 Роль антитіл у боротьбі з вірусною інфекцією**

Значною противірусною активністю володіють нейтралізуючі антитіла (nAbs). При взаємодії вірусів з ними відбувається гальмування інфекційного процесу.

Прикріплення віріона до клітини є початковою стадією інфекції. Один із механізмів дії nAb – інгібування взаємодії вірусу та його клітинного домену прикріплення (Рис. 1.6 с). Прикладом є нейтралізація риновірусу людини 14 за допомогою моноклональних антитіл (mAb), які гальмують його зв'язування з рецептором ICAM-1 [62]. Місце кріплення рецептора на поверхні віріона знаходиться в заглибленні (каньйоні), недоступному для антитіл, але оточеному імуногенними зонами. mAb бівалентно зв'язуються у цих доступних ділянках та запобігають прикріпленню. Це доводить, що nAb не обов'язково мають зв'язуватися у зоні вірус-рецепторної взаємодії.

Агрегація за допомогою nAb зменшує кількість віріонів, здатних ініціювати зараження, і знижує загальну вірулентність (Рис. 1.6 а) [63, 64]. Міра нейтралізації залежить від кількості зв'язаних частинок. Так, наприклад, агрегація п'яти віріонів призводить до п'ятикратного зниження вірулентності, однак окремі віріони у “зв'язці” залишаються небезпечними, а деагрегація може відновити заразність. Більше того, агрегація імовірно сприяє кращому захисту від вірусної інфекції *in vivo*, адже ускладнює циркуляцію віріонів та полегшує фагоцитоз імунними клітинами [65].

Найбільшим викликом для вірусів є подолання клітинної мембрани. Багато вірусів не використовують ендоцитоз для інтерналізації. Натомість, вони ініціюють злиття мембран. Більше того, віріони, що інтерналізуються шляхом ендоцитозу, також змушені долати мембрану ендосоми. Зв'язування nAb з поверхневим вірусним білком може запобігти подальшій взаємодії

віріона з клітинним рецептором, аналогічно до вже описаного механізму, або може стати перешкодою процесу злиття мембран, заважаючи їхньому достатньому зближенню (Рис. 1.6 d, f) [44]. Сучасні моделі інтерналізації передбачають, що більше ніж один шип необхідний для завершення злиття. Кілька шипів кооперативно утворюють комплекс, який відкриває пору для проникнення [45]. Якщо nAb зв'язуються з достатньою кількістю шипів, процес інтерналізації порушується [65].

Доведено, що зв'язування деяких mAb з поліовірусом призводить до дестабілізації віріону і виходу вірусної РНК в міжклітинне середовище (Рис. 1.6 b) [66]. Антитіло MAб35-1f4 агрегує та розриває капсид поліовірусу за нормальних фізіологічних умов та температури 38-39°C [67]. Очевидно, що поява екзогенних структур всередині організму викличе адекватну імунну відповідь, оскільки у такому вигляді вірус не зможе інгібувати її.

Необхідна концентрація nAb для зупинення процесу зараження зазвичай вимірюється при втраті вірулентності 63% віріонів (відповідно до розподілу Пуассона). Дослідження Wohlfart аденовірусу і Wetz поліовірусу показали, що в середньому лише 1-1.4 антитіл (IgG) достатньо для їхньої нейтралізації [68, 69]. Результати інших експериментів свідчать, що нейтралізація аденовірусу, поліовірусу, IAV, і вірусу сказу потребувала в середньому від 3 nAb (IgG) для аденовірусу до 200 nAb (IgG) на віріон сказу для 63% нейтралізації [69-71]. Така відмінність обумовлена багатьма параметрами nAb та вірусів. Перш за все, з боку вірусу має значення розмір віріону, антигенних поверхонь вірусних рецептор-зв'язуючих структур, кількість таких ділянок, їх функціональність, близькість одна до одної та до інших поверхневих структур (Рис. 1.7).

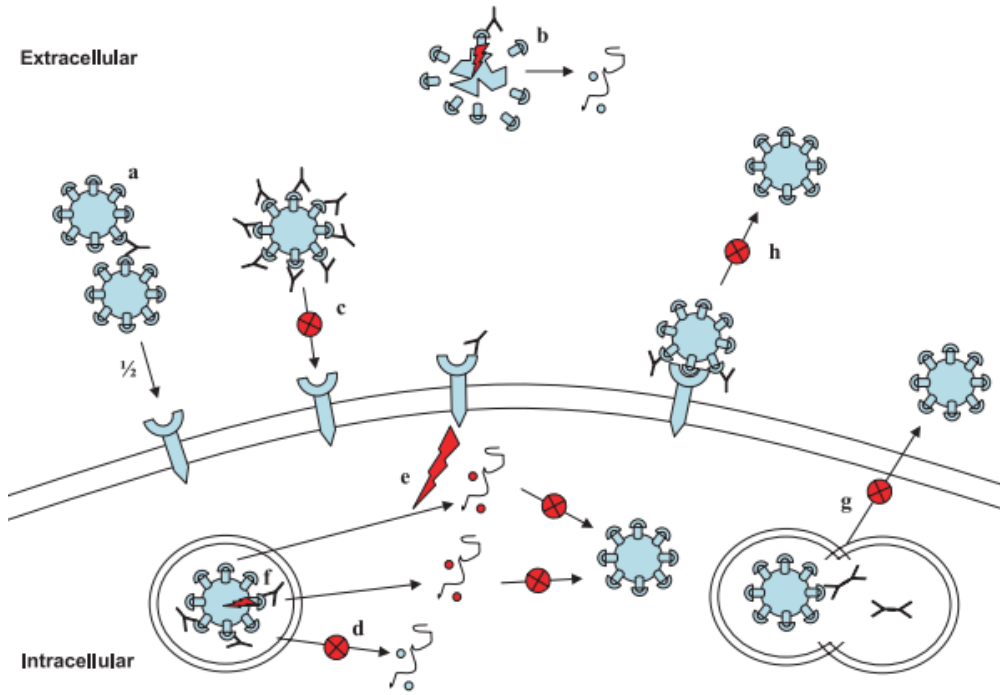


Рис. 1.6 – Механізми нейтралізації вірусів антитілами

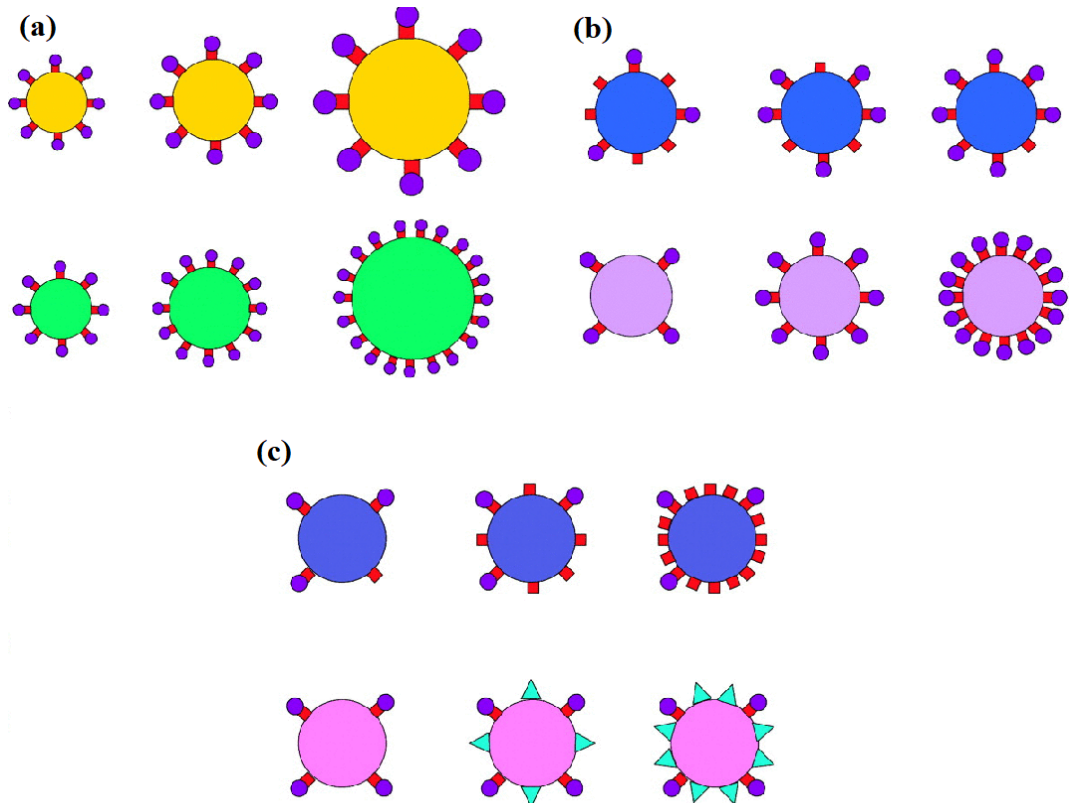


Рис. 1.7 – порівняння вірусних частинок за розміром та поверхневими структурами

На схемі 1.7 зображені основні відмінності між вірусами, що впливають на перебіг нейтралізації. (a): Ефективна концентрація nAb залежить від розміру та кількості шипів. На більшу поверхню білка шипа відповідно потрібно більше антитіл. Занадто близьке розміщення шипів може заважати нейтралізації. (b): Деякі віруси можуть втрачати зовнішній білок шипа. Якщо для інтерналізації трьох віріонів верхнього ряду потрібна однакова кількість повноцінних шипів, мінімальна нейтралізуюча “доза” збільшиться зліва направо. Віріони нижнього ряду не втрачають шипових білків, але їхня кількість в межах одного виду різниться, як і потреба у nAb. У верхньому ряду (c) зображені три віріони однакового розміру з постійною кількістю функціональних шипів. Зовнішній білок шипа втрачається в різній мірі, відкриваючи інертний залишок. Теорія нейтралізації передбачає, що із збільшенням щільності нефункціональних шипів, антитіла, що прив'язуються до них, будуть ефективніше нейтралізувати вірус. За таким самим принципом нейтралізуючими будуть Abs до нефункціонального поверхневого білку із нижнього ряду.

Антитіла потенційно можуть зв'язати будь-яку доступну вірусну поверхню. Натомість віруси, що швидко мутують, можуть уникнути mAb, навіть якщо вони зв'язуються з структурами, важливими для реплікації або сайтами зв'язування рецепторів [72]. Мутації імунодомінантних структурних петель, що утворюють антитіло-зв'язуючі ділянки і мутації, що призводять до зміни ділянок приєднання до рецепторів, є основними механізмами, за допомогою яких віруси уникають нейтралізації [73, 74].

Деякі дослідження показують, що афінність nAb до вірусу не завжди корелює зі ступенем вірулентності. Наприклад, значне підвищення афінності anti-HIV-1 gp120-специфічного FAb b12 призвело лише до незначного підвищення нейтралізації [75].

Вважається, що здатність антитіла до зв'язування з віріоном головним чином залежить від гнучкості шарнірної області, яка визначається ізотипом антитіла, розмахом FAb, і відстанню між вірусними епітопами [65].

Важливими перевагами антитіл людини як терапевтичних засобів є низька або незначна токсичність в поєднанні з високою ефективністю і тривалим періодом напіврозпаду. Однак, до недоліків відносять генерацію нейтралізаційно стійких штамів вірусу, обмежений доступ великих молекул антитіл до місця реплікації вірусу, відсутність пероральних рецептур і висока вартість виробництва і зберігання [1]. Багато вірусів, особливо РНК-віруси, можуть значно відрізнятися за послідовністю навіть між ізолятами. Отже, виділення сильнодіючих, широко нейтралізуючих антитіл є важливою метою для розробки вакцин.

### **1.5 Імуноглобуліни М у боротьбі з вірусами**

Слизова оболонка є захисним бар'єром для органів дихання, шлунково-кишкового тракту та сечостатевої системи. Вона постійно піддається впливу різноманітних бактерій, вірусів, грибків та токсинів. Загальна площа поверхні епітеліального бар'єру у людини становить близько 400 м<sup>2</sup> [76]. Серед безлічі ефektorів імунітету слизової оболонки особливе значення мають IgM.

Полімеризація пентамерних IgM відбувається завдяки домену з'єднання J (J chain) [77]. Наївні В-клітини до активації виробляють поліклональні IgM. Їхні 10 Fab мають майже безмежний потенціал у розпізнаванні вірусних епітопів. IgM виступають nAb у крові, на поверхні слизових оболонок та внутрішньоклітинно. Ці антитіла активно переносяться через слизовий епітелій після зв'язування J-домену з рецептором полімерних імуноглобулінів (pIgR) та здатні навіть під час трансцитозу боротися з вірусами [78-83]. Дослідження Bomsel et al показало, що базолатерально інтерналізовані IgM зв'язувалися з трансцитуючими віріонами в цитоплазмі та доставляли вірус назад у слиз на поверхні клітин [83].

Хоча афінність до віріонів поліклональних IgM є низькою, за певних

концентрації може відбуватися їх ефективне зв'язування [84]. Висока авідність у цьому випадку здебільшого забезпечується не силою взаємодії, а полівалентністю антитіл. Також IgM відіграють визначну роль у запобіганні поширенню вірусної інфекції кров'ю [85]. Зазвичай активне посилене вироблення IgA, IgM, та IgG починається після значного розмноження вірусу у лімфатичних вузлах протягом 1-3 днів. Цього часу може вистачити для поширення вірусу організмом та назовні організму [86].

Дослідження Adrian et демонструють, що підвищена концентрація IgM у крові рятувала 75-87.5% мишей від VSV при смертності контрольної групи 100% [87]. Систематизуючи попередні розділи, така ефективність IgMs може пояснюватися декількома факторами:

- 1) IgMs мають 10 Fabs, порівняно з 2 Fabs у IgGs, IgEs, IgDs та 4 Fabs у IgAs. Це дає набагато більший потенціал для агрегації віріонів.
- 2) Молекула IgM має молярну масу 990 кДа, порівняно з 150-400 кДа у інших типів антитіл [88]. Відповідно, розміри молекул (та комплексів антитіл з агрегованими вірусами) також суттєво відрізняються. Це полегшує фагоцитоз для імунних клітин, дає перевагу у запобіганні циркуляції віріонів та злитті мембран.
- 3) Здатність переноситись крізь епітелій та зв'язувати трансцитуючі віруси є унікальною для антитіл з J-доменом.

## **1.6 Вірус трансмісивного гастроентериту**

Відомо, що віруси родини *Coronaviridae* також можуть використовувати метод проникнення, подібний до описаного раніше для HCMV. Наприклад, для інтерналізації вірусу трансмісивного гастроентериту (TGEV) зазвичай необхідні рецептори двох типів: EGFR та амінопептидаза N (APN) [89, 90]. Вірус трансмісивного гастроентериту спричиняє кластеризацію APN і EGFR на початку інфекції. Інтерналізація TGEV здійснюється через клатрин- і

кавеолін-опосередкований ендоцитоз після активації EGFR у ентероцитах кишківника свиней IPES-J2 [90].

Вірус трансмісивного гастроентериту є ssPHK вірусом, що швидко мутує та викликає важку діарею і високу смертність у новонароджених поросят. Виключна здатність до мутації зумовлює широкий тропізм вірусу всередині організму та легку передачу між видами тварин. Жодного випадку зараження людини поки виявлено не було [90, 91].

### **1.7 Клітинна лінія LLC-PK1**

Лінія епітеліальних клітин нирки свині LLC-PK1 добре описана та широко використовується у дослідженнях мітогенезу, впливу гормонів та токсинів [92]. LLC-PK1 є ідеальними кандидатами для моделювання вірус-клітинної взаємодії, адже достатня експресія EGFR дозволяє реєструвати точні та показові результати взаємодії рецептора з його лігандами.

Під час експериментального пошуку клітин, чутливих до TGEV, була обрана саме ця клітинна лінія. Була встановлена її середня інфекційна доза (TCID<sub>50</sub>), Рецептори EGF клітин активувалися при додаванні EGF та TGEV. Для цієї лінії успішно була відпрацьована методика кількісного порівняння активації рецептора.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Отримання рекомбінантного епідермального фактору росту

#### 2.1.1 Напрацювання рекомбінантного білку в культурі клітин з надекспресією епідермального фактору росту

Культуру *E. coli* (DE3) з рекомбінантною плазмідною рЕТ 10xHis-SUMO-EGF людини було надано в користування Відділом біології клітини Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Культуру інкубували на шейкері (300–350 об/хв.) у рідкому середовищі LB з додаванням ампіциліну (100 мкг/мл) до досягнення значення оптичної густини 0.8-1 при довжині хвилі 600 нм (LLG-uniSPEC 2, Китай).

Потім, додаючи ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозид (IPTG) (1мМ), інкубували протягом 4-5 годин (300–350 об/хв.) при температурі +35°C. Центрифугували 30 хв при 3000g за температури +4°C. Осад зберігали за температури -20°C.

#### 2.1.2 Очищення рекомбінантного епідермального фактору росту

Осад ресуспендували у лізисному буфері (100 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 1 мМ PMSF (Sigma), рН 8.0) та обробляли ультразвуком 15 хв (30 с сонікування – 30 с перерва) на льоду з амплітудою 75% (Sonopuls 3100, Bandelin, Німеччина). Лізат центрифугували 30 хв за температури +4°C та 13500 g. Відібраний супернатант додавали до хроматографічної колонки з

Ni-NTA агарозою (Sigma), що використовується для очищення білків з полігістидиновим тегом. Очищення білка проводили нативним методом за стандартним протоколом [93]. Концентрація білків була визначена за методом Грінберга при довжині хвилі 610 нм (LLG-uniSPEC 2, Китай) [94]. Якість очищення перевірялася за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) з градієнтом концентрації гелю 7-22% (забарвлення Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Канада)) за стандартним протоколом [95].

Буфер у елюаті з очищеним комплексом 10xHis-SUMO-EGF та імідазолом заміняли на буфер для розщеплення (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 25% гліцерол, pH 8.0) за методом ексклюзивної хроматографії (колонка PD10 зі смолою Sephadex G25 (Sigma)). До отриманого розчину додавали протеазу Ulp1 (ThermoFisher Scientific) в пропорції по білку 1:30 та інкубували 2 години за температури +30°C та постійного перемішування. Розділення комплексів 10xHis-SUMO та білку EGF проводили за допомогою Ni-NTA агарози (Sigma) нативним методом за стандартним протоколом [93]. Якість очищення та концентрацію білка визначали за допомогою SDS-PAGE з градієнтом концентрації гелю 7-22% за стандартним протоколом (забарвлення Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Канада)) та програмного забезпечення Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences) шляхом калібрування з білком бичачого сироваткового альбуміну (BCA) [95].

## 2.2 Культура LLC-PK1

Лінію LLC-PK1 було люб'язно передано із колекції клітин Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України. Лінію культивували в середовищі DMEM (Sigma) з 10% фетальною бичачою сироваткою (ФБС) (Sigma), в інкубаторі за температури +37°C з 5% вмістом CO<sub>2</sub> у вологій атмосфері. Пасажування культури LLC-PK1 проводили

після досягнення нею моношару. Середовище культивування змінювали кожну другу добу. Перед проведенням інкубації клітин вірусом, фактором росту на антитілами культура 18 годин перебувала у середовищі без ФБС.

### **2.3 Вірус трансмісивного гастроентериту**

Вірус трансмісивного гастроентериту було надано співробітниками Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України. Роботу з вірусом проведено у співпраці із колективом інституту.

### **2.4 Отримання сумарних імуноглобулінів М із сироватки венозної крові матерів та пуповинної крові новонароджених**

#### **2.4.1 Отримання та підготовка зразків сироваток**

Було відібрано 10 пар сироваток венозної крові матерів та пуповинної крові їхніх немовлят у Пологовому будинку 5, Київ, Україна. Усі донори були здорові та попередньо надали письмову згоду на дослідження. Усі процедури попередньо були затверджені етичним комітетом досліджень НДІ “Медлайф”.

Пуповинну кров немовлят було зібрано відразу після народження. Кров матерів було зібрано шляхом венопункції в день доставки. Свіжозібраним зразкам крові давали згорнутися шляхом інкубації протягом 30 хв при +37°C, потім тримали 12 год при +4°C. Сироватку отримували шляхом центрифугування протягом 30 хв при 1500 g за температури +4°C та зберігали в 50% сульфаті амонію при +4 °C.

### **2.4.2 Очистка імуноглобулінів М**

Отримання сумарних препаратів IgM проводили за методикою Rogribna et al [96]. Для отримання IgM з сироваток пуповинної та венозної крові кожен зразок обробляли насиченим сульфатом амонію при +4°C. Після центрифугування при 2500 g протягом 1 год випадав осад, який розчиняли у фосфатно-сольовому буфері (PBS) і знову обробляли сульфатом амонію при +4°C протягом ночі. Після центрифугування при 2500 g протягом 1 години при +4°C осад розчиняли в PBS. Фракції зразків з пуповинної крові немовлят з'єднували між собою, так само, як і фракції зразків з венозної крові матерів. Об'єднані зразки пропускали крізь 0,45 мкм фільтр та очищали від IgGs за допомогою хроматографічної колонки з Protein G-агарозою (АВТ, Іспанія). IgMs із сироваток виділяли та концентрували за допомогою колонкової хроматографії з анти-IgM-смолою (Thermo Scientific, Голландія).

Очищені поліклональні препарати IgMs пропускали крізь 0,2 мкм фільтр у стерильних умовах та зберігали в аліквотах у 0,1 М гліциновому буфері, рН 7,4 при +4°C.

Перевірка концентрацій та якості очистки проводилася за допомогою SDS-PAGE з градієнтом концентрації 7-22% за стандартним протоколом (забарвлення Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Канада)) та програмного забезпечення Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences) шляхом калібрування з БСА [95].

### **2.5 Визначення середньої інфекційної дози вірусу трансмісивного гастроентериту для культури LLC-RK1**

Титрування інфекційності вірусних матеріалів на культурах клітин проводили методом кінцевих розведень по цитопатичній дії (ЦПД). Результати обраховували через 120 годин культивування при 38°C. Ступінь

ЦПД визначали по зміні морфології клітин (округлення, зморщування, відторгнення від поверхні лунок дегенеративно змінених клітин). У експериментах використовували інфекційний титр TGEV 5,0-8,5 lg TCID<sub>50</sub>.

## **2.6 Визначення цитотоксичної дії сумарних імуноглобулінів М людини для культури LLC-PK1**

Для визначення концентрації 50% цитотоксичності (CC<sub>50</sub>) сумарних препаратів IgM використовували використовували не менше десяти рядів лунок в планшетах з культурою LLC-PK1 для кожного розведення препарату у культуральному середовищі. Планшети з культурою клітин інкубували за температури +37°C з 5% вмістом CO<sub>2</sub> у вологій атмосфері протягом 5 днів. Щодня проводили спостереження за дослідними і контрольними зразками культур з метою встановлення наявності або відсутності ЦПД. Ступінь ЦПД визначали по зміні морфології клітин (округлення, зморщування клітин, відторгнення від поверхні лунок дегенеративно змінених клітин).

## **2.7 Оцінювання впливу препаратів на репродукцію вірусу трансмісивного гастроентериту**

Для вивчення антикоронавірусної активності препаратів використовували добові культури клітин LLC-PK1 та вірус трансмісивного гастроентериту. Клітини вирощували в плашках на середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% ФБС при температурі 37°C в термостаті з 5% CO<sub>2</sub>.

Культуральне середовище зростання зливали, до клітин вносили досліджувані препарати в різних концентраціях. Через 1 годину контакту вносили вірус в дозі 100 TCID<sub>50</sub>. Культури інкубували в термостаті з подачею CO<sub>2</sub> протягом 32 годин, щодня контролюючи за допомогою мікроскопа і

оцінюючи репродукцію вірусу по ЦПД LLC-PK1 та порівнюючи з контрольними культурами, де моношар не піддавався ніяким впливам. Культуральне середовище з лунок планшет було зібране і в ньому визначали інфекційний титр.

## **2.8 Вестерн блот аналіз**

### **2.8.1 Перевірка сигналу активації рецептора епідермального фактору росту у клітинах LLC-PK1**

Культуру клітин LLC-PK1 було передінкубовано з різними концентраціями рекомбінантного (rEGF) та виділеного із підщелепних залоз миші (mEGF) епідермального фактору росту (використано як референтний) протягом різного проміжку часу. Епідермальний фактор росту, виділений із підщелепних залоз миші, було надано Відділом біології клітини Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Білки клітинних лізатів було розділено за допомогою поліакриламідного гель-електрофорезу з градієнтом концентрації гелю 7-22%. Для запобігання небажаним ефектам, що виникають через макромолекули ДНК під час гель-електрофорезу, лізати попередньо було соніковано (Sonopuls 3100, Bandelin, Німеччина) та піддано кільком циклам температурної обробки (+20°C – -70°C).

Вестерн блот аналіз проводили з використанням мишачих антитіл анти-rY (Sigma) та анти-мишачого кон'югату з пероксидазою хрому (Sigma). Для визначення молярної маси білків використовували забарвлений маркер (VWR Chemicals, США). Результати візуалізували за допомогою субстрату

для пероксидази на основі люмінолу ECL (Amersham Biosciences, Німеччина) та рентгенівських плівок (Онiко, Україна).

### **2.8.2 Дослідження ефективності інгібування інтерналізації вірусів імуноглобулінами M**

Культуру клітин LLC-PK1 протягом години було передінкубовано з EGF, TGEV, сумарними препаратами пуповинних та материнських IgM, вірусом та попередньо інкубованою протягом години сумішшю імуноглобулінів з TGEV.

За допомогою поліакриламідного гелі-електрофорезу з градієнтом концентрації гелю 7-22% було розділено однакові кількості білків клітинних лізатів.

Вестерн блот аналіз проводили з використанням мишачих антитіл анти-pY (Sigma), анти- $\beta$ -актин (Sigma) та анти-мишачого кон'югату з пероксидазою хрому (Sigma). За сигналом  $\beta$ -актину перевіряли ідентичність концентрацій нанесених зразків. Для визначення молярної маси білків було використано забарвлений маркер (VWR Chemicals, США). Результати візуалізували за допомогою субстрату для пероксидази на основі люмінолу ECL (Amersham Biosciences, Німеччина) та рентгенівських плівок (Онiко, Україна). Обрахунок результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Image J (NIH, США) та Origin 2018 (OriginLab Corporation, США).

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1 Результати визначення середньої інфекційної дози вірусу трансмісивного гастроентериту для культури LLC-PK1

Культуру LLC-PK1 було заражено коронавірусом TGEV та визначено TCID<sub>50</sub>. Цитопатична дія TGEV на клітини лінії LLC-PK1 морфологічно проявляється в утворенні дрібноклітинної дегенерації (Рис. 3.1, 3.2). TCID<sub>50</sub> у даному випадку становила 5,0-8,5 lg.



Рис. 3.1 – Культура LLC-PK1 у нормальному стані

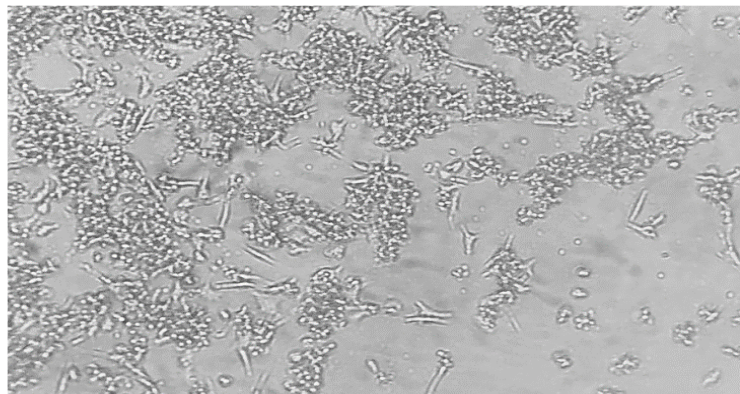


Рис. 3.2 – Культура клітин LLC-PK1, інфікована TGEV

### 3.2 Результати визначення цитотоксичної дії сумарних імуноглобулінів М людини для культури LLC-PK1

Сумарними препаратами IgM, виділеними із пуповинної крові новонароджених та венозної крові породіль не було проявлено цитотоксичної дії на культуру LLC-PK1. Морфологія клітин не змінювалася після додавання поліклональних препаратів протягом усього експерименту.

### 3.3 Оцінка впливу препаратів на репродукцію вірусу трансмісивного гастроентериту

Оцінено вплив препаратів на репродукцію вірусу трансмісивного гастроентериту у культурі LLC-PK1. Визначено напівмаксимальну ефективну концентрацію антикоронавірусних препаратів ( $EC_{50}$ ) в культурі клітин LLC-PK1 протягом 4, 8, 16, 32 годин (Рис. 3.3-3.5).

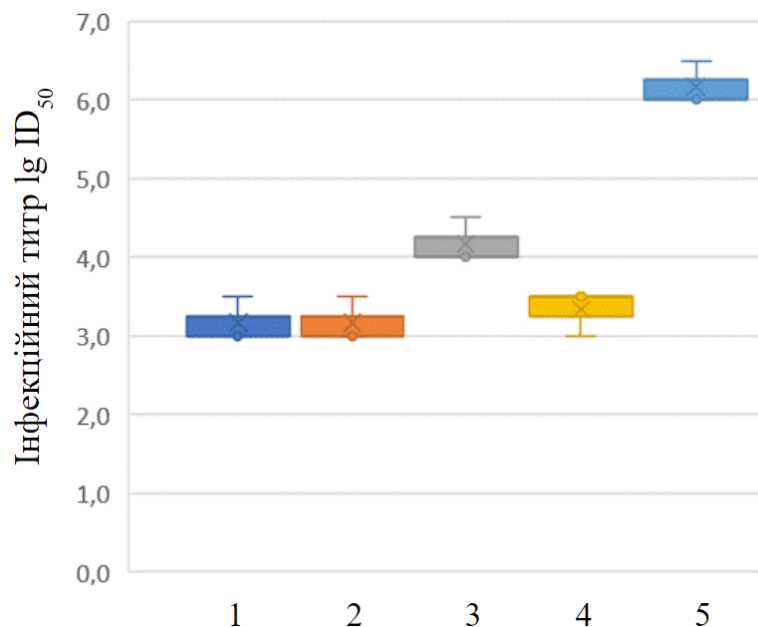


Рис. 3.3 – Антикоронавірусна активність ( $EC_{50}$ ) препарату сумарних IgM, отриманих з сироваток венозної крові породіль в культурі клітин LLC-PK1 на

основі оцінки  $ID_{50}$ . 1 – 4 год.; 2 – 8 год.; 3 – 16 год.; 4 – 32 год.;  
5 – вірусний контроль зараження культури LLC-PK1 без внесення препаратів

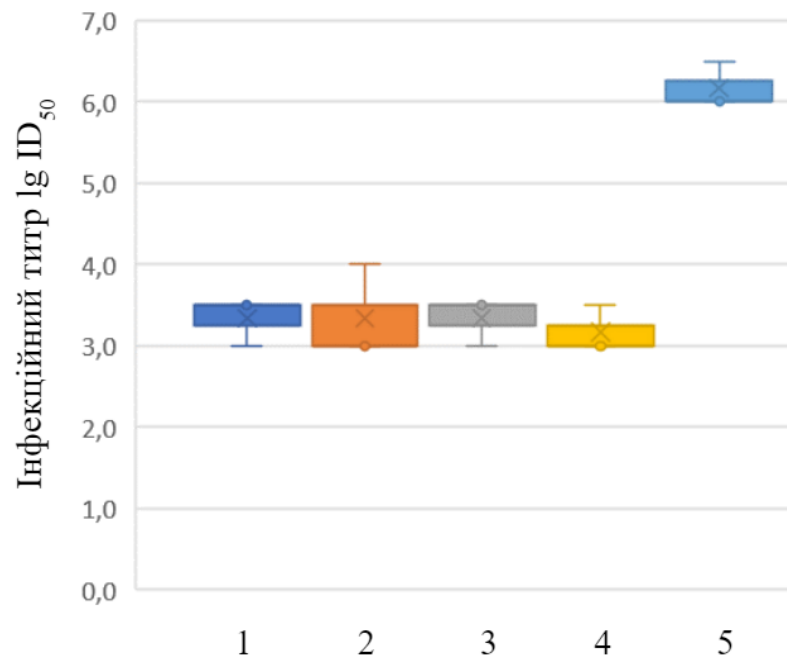


Рис. 3.4 – Анतिकоронавірусна активність ( $EC_{50}$ ) препарату сумарних IgM, отриманих з сироваток пуповинної крові новонароджених в культурі клітин LLC-PK1 на основі оцінки  $ID_{50}$ . 1 – 4 год.; 2 – 8 год.; 3 – 16 год.; 4 – 32 год.; 5 – вірусний контроль зараження культури LLC-PK1 без внесення препаратів

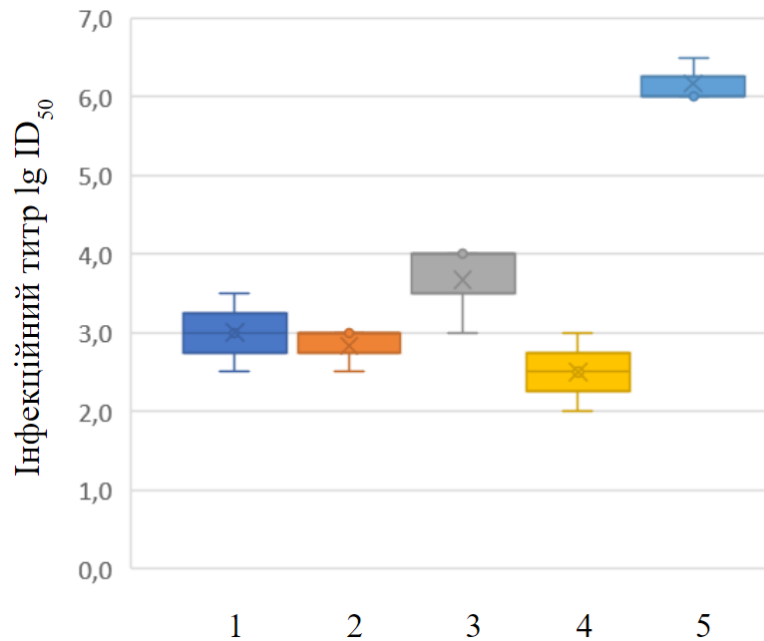


Рис. 3.5 – Анतिकоронавірусна активність ( $EC_{50}$ ) сумарних IgG, отриманих з сироваток донорської крові (комерційний препарат) в культурі клітин LLC-PK1 на основі оцінки  $ID_{50}$ . 1 – 4 год.; 2 – 8 год.; 3 – 16 год.; 4 – 32 год.; 5 – вірусний контроль зараження культури LLC-PK1 без внесення препаратів

### 3.4 Перевірка активації рецептора рекомбінантним та мишачим епідермальним фактором росту

Рекомбінантний людський EGF людини активує EGFR у клітинах епітелію нирки свині LLC-PK1 однаково з EGF, виділеним із підщелепних залоз миші. На Рисунку 3.6 показано фосфорилювання рецептора, індуковане rEGF та mEGF протягом різних проміжків часу та при додаванні різних концентрацій факторів росту в досліджувану систему.

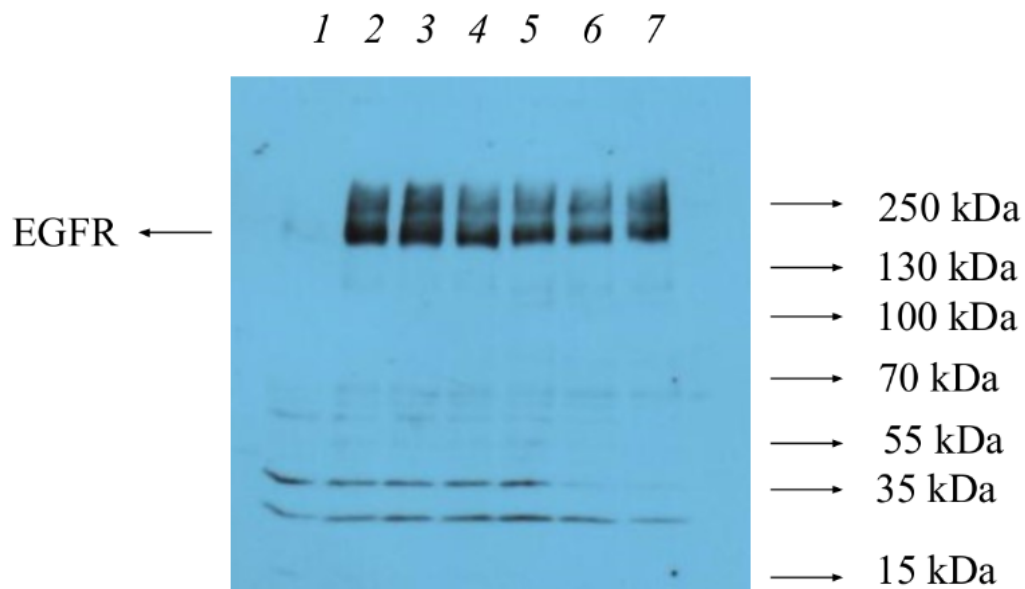


Рис. 3.6 – Фосфорилування EGFR клітин лінії LLC-PK1.

1 – контроль; 2 – 0,01 мг/мл mEGF, 15 хв; 3 – 0,02 мг/мл rEGF, 15 хв;  
 4 – 0,01 мг/мл rEGF, 15 хв; 5 – 0,01 мг/мл mEGF, 30 хв; 6 – 0,02 мг/мл rEGF,  
 30 хв; 7 – 0,01 мг/мл rEGF, 30 хв

### 3.5 Фосфорилування рецептора епідермального фактору росту у відповідь на інкубацію з різними сполуками. Інгібування інтерналізації вірусу

Інтерналізацію коронавірусу TGEV в культуральну лінію LLC-PK1 було інгібовано інкубацією з сумарними препаратами IgM, виділеними із пуповинної крові новонароджених та венозної крові породіль. Про це свідчить різке зменшення сигналу активації EGFR порівняно із контролем зараження TGEV без внесення препаратів, оскільки, за даними літератури, фосфорилування EGFR є обов'язковим для потрапляння TGEV всередину клітини. (Рис. 3.7). Еквівалентність концентрацій нанесених зразків доведено однаковими сигналами  $\beta$ -актину (Рис. 3.7).

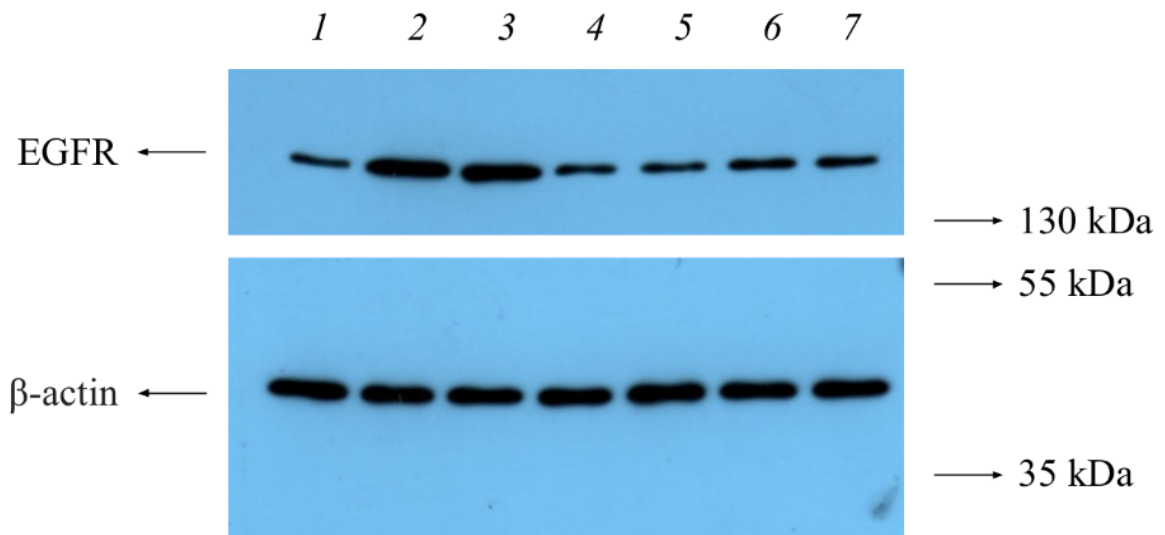


Рис. 3.7 – Фосфорилування рецепторів EGFR

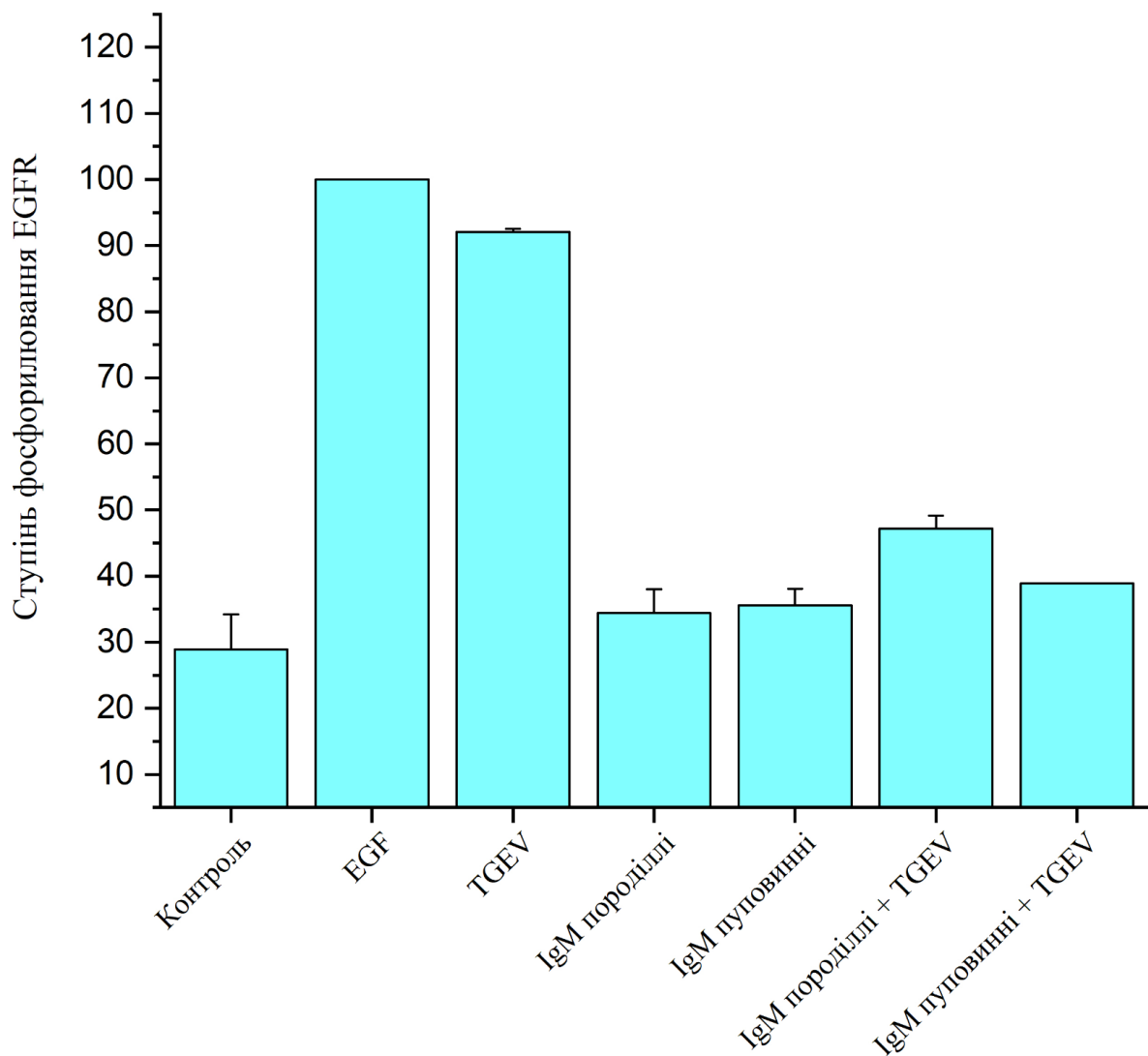
1 – контроль; 2 – рекомбінантний EGF (0,01 мг/мл); 3 – TGEV; 4 – IgM породіллі (0,8 мг/мл); 5 – IgM пуповинні (0,8 мг/мл); 6 – IgM породіллі (0,8 мг/мл) + TGEV; 7 – IgM пуповинні (0,8 мг/мл) + TGEV

### 3.6 Статистична обробка сигналів фосфорилування рецептора епідермального фактору росту

Даними, що виходять із статистичної обробки, показано, що, судячи з сигналу фосфотирозину, сумарним препаратом пуповинних IgM у концентрації 0,8 мг/мл було інгібовано проникнення більше 63% віріонів (Рис. 3.8). Також пуповинні IgM мають кращі противірусні властивості, ніж материнські. Це свідчить про те, що авідність певного пулу імуноглобулінів M залежить від гетерогенності антитіл в імунній сироватці, специфічних до певної антигенної детермінанти. Порівнюючи спроможність імуноглобулінів різних класів взаємодіяти з вірусом, стає зрозуміло, що на міцність зв'язку між антитілом та вірусом також може впливати ступінь полівалентності взаємодії (Рис. 3.5, 3.8).

Застосованими сумарними препаратами імуноглобулінів M людини не

було спричинено значної активації EGFR у клітинах епітелію нирки свині LLC-PK1 (Рис. 3.8).



.Рис. 3.8 – Статистична обробка сигналів фосфорилування EGFR у клітинах лінії LLC-PK1 після передінкубування з наступними сполуками: Контроль; Рекombінантний EGF (0,01 мг/мл); TGEV; IgM породілі (0,8 мг/мл); IgM пуповинні (0,8 мг/мл); IgM породілі (0,8 мг/мл) + TGEV; IgM пуповинні (0,8 мг/мл) + TGEV

## ВИСНОВКИ

- 1) Порівняно ефективність запобігання інтерналізації коронавірусу у тваринні клітини сумарними препаратами IgM, виділеними із пуповинної крові новонароджених та венозної крові породіль. Доведено, що випробувані препарати є потенційними противірусними засобами, що майже не втручаються у роботу рецептора EGF.
- 2) Більш гетерогенні сумарні препарати IgM новонароджених більш ефективно пригнічували інфікування клітин вірусом трансмісивного гастроентериту. Судячи з результатів проведених дослідів, пуповинними IgM було інгібовано проникнення більше 63% віріонів, що відповідає показникам нейтралізуючих антитіл.
- 3) Стратегія використання IgM, вироблених наївними В-клітинами потенційно може використовуватися на початкових етапах епідемії, коли вірус вже відомий, але промислове виробництво специфічних вакцин ще не налагоджене.
- 4) Подальше дослідження пуповинних IgM є перспективним напрямком розвитку для розробки ефективних та унікальних противірусних засобів. IgM новонароджених мають ряд переваг порівняно з іншими антитілами. Зокрема, нівелювання значної мутаційної спроможності вірусів завдяки неможливості пристосування до безлічі варіабельних ділянок Fab гетерогенних IgM.
- 5) Для виконання роботи було випробувано та застосовано оригінальну модель вірус-клітинної взаємодії, що дозволяє точно оцінювати ефективність інгібіторів інтерналізації вірусів. Однією із важливих переваг даної моделі є її безпечність. Також аналогічна концепція може бути ефективно застосована для інших вірусів, що використовують EGFR для потрапляння в клітину.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Kwong P, Doyle M, Casper D. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature*. 2002;420:678–682.
2. Dimitrov DS. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol*. 2004, 2(2):109-122.
3. Lin PF, Blair W, Wang T, Spicer T, Guo Q, Zhou N, Gong YF, Wang HG, Rose R, Yamanaka G, Robinson B, Li CB, Fridell R, Deminie C, Demers G, Yang Z, Zadjura L, Meanwell N, Colonna R. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):11013-8.
4. Arkin MR, Randal M, DeLano WL, Hyde J, Luong TN, Oslob JD, Raphael DR, Taylor L, Wang J, McDowell RS, Wells JA, Braisted AC. Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1603-8.
5. Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*. 1996;274(5292):1531-4.
6. Keyt BA, Baliga R, Sinclair AM, Carroll SF, Peterson MS. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. *Antibodies (Basel)*. 2020;9(4):53.
7. van Furth R, Schuit HR, Hijmans W. The immunological development of the human fetus. *J Exp Med*. 1965;122(6):1173-88.
8. Sleeman MA, Watson JD, and Kumble KD. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem* 276, 2001;18265–18271.
9. Tsahar E, Moyer JD, Waterman H, Barbacci EG, Bao J, Levkowitz G, Shelly M, Strano S, Pinkas-Kramarski R, Pierce JH, Andrews GC, and Yarden Y. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *EMBO J*, 1998;15: 5948–5963.

10. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 2001;37 Suppl 4:S3-8.
11. Huang H, Li L, Wu C, Schibli D, Colwill K, Ma S, Li C, Roy P, Ho K, Songyang Z, Pawson T, Gao Y, Li SS. Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain. *Mol Cell Proteomics*, 2008;7(4):768-84.
12. Lui VW, Grandis JR. EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Research*, 2002;22(1A):1-11.
13. Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:443-78.
14. Pandiella A, Beguinot L, Vicentini LM, Meldolesi J. Transmembrane signalling at the epidermal growth factor receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10(10):411-4.
15. Jing D, Sampath R, Kulbhusan T, Zhe J, Serrine L et al. EGFR-independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2004;287:5, F1049-F1058.
16. Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, and Parsons SJ. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*. 1999;274: 8335–8343.
17. Bishayee A, Beguinot L, and Bishayee S. Phosphorylation of tyrosine 992, 1068, and 1086 is required for conformational change of the human epidermal growth factor receptor C-terminal tail. 1999;*Mol Biol Cell* 10: 525–536.
18. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, and Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. 1999;*Mol Cell* 4: 1029–1040.
19. Sakaguchi K, Okabayashi Y, Kido Y, Kimura S, Matsumura Y, Inushima K, and Kasuga M. Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells.

1998;Mol Endocrinol 12: 536–543.

20. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, and Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. 2000;Nat Cell Biol 2: 249–256.

21. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. Pharmacol. Res. 2014;79:34–74.

22. Dong J, Ramachandiran S, Tikoo K, Jia Z, Lau SS, Monks TJ. EGFR-independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death. Am J Physiol Renal Physiol. 2004;287(5):F1049-58.

23. Bajaj M. Waterfield M.D. Schlessinger J. Taylor W.R. Blundell T. On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. Biochim. Biophys. Acta. 1987;916: 220-226.

24. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell. 2002;110(6):775-87.

25. Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. Cell. 2002;110:763–773.

26. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2010;141(7):1117-34.

27. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TPJ, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ ErbB receptors. Mol Cell. 2003;12:541–552.

28. Bouyain S, Longo PA, Li S, Ferguson KM, Leahy DJ. The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:15024–15029.

29. Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46265-72.
30. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(7):505-16.
31. Wiley, H. S. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp. Cell Res.* 2003;284, 78–88.
32. Levkowitz, G. et al. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell.* 1999; 4, 1029–1040.
33. Vehlow A, Soong D, Vizcay-Barrena G, et al. Endophilin, Lamellipodin, and Mena cooperate to regulate F-actin-dependent EGF-receptor endocytosis. *EMBO Journal.* 2013; 63: 2722–2734.
34. Lund KA, Lazar CS, Chen WS, Walsh BJ, Welsh JB, Herbst JJ, Walton GM, Rosenfeld MG, Gill GN, Wiley HS. Phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at threonine 654 inhibits ligand-induced internalization and down-regulation. *J Biol Chem.* 1990;265(33):20517-23.
35. Chen WS, Lazar CS, Lund KA, Welsh JB, Chang CP, Walton GM, Der CJ, Wiley HS, Gill GN, Rosenfeld MG. Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation. *Cell.* 1989;59(1):33-43.
36. de Souza GAP, Queiroz VF, Coelho LFL, Abrahão JS. Alohomora! What the entry mechanisms tell us about the evolution and diversification of giant viruses and their hosts. *Curr Opin Virol.* 2021;47:79-85.
37. Smatti MK, Cyprian FS, Nasrallah GK, Al Thani AA, Almishal RO, Yassine HM. Viruses and Autoimmunity: A Review on the Potential Interaction and Molecular Mechanisms. *Viruses.* 2019;11(8):762.
38. McFadden G, Moyer R. Poxvirus growth factors related to epidermal growth factor. *Cytokine Reference Database*, ed. Oppenheim JJ, Feldmann M. <http://www.academicpress.com/cytokinereference> (accessed May 8, 2022).

39. Kato S, Miyamoto H, Tarahashi M, Kamahora J. Shope fibroma and rabbit myxoma viruses. II. Pathogenesis of fibromas in domestic rabbits. *Biken J.* 1963;6:135-43.
40. Blomquist MC, Hunt LT, Barker WC. Vaccinia virus 19-kilodalton protein: relationship to several mammalian proteins, including two growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(23):7363-7.
41. Sieczkarski SB, Whittaker GR. Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 7):1535-1545.
42. Pelkmans L, Püntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 2002;296(5567):535-9.
43. Lee J, Lentz BR. Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998;95:9274–9279.
44. Chernomordik LV, Leikina E, Frolov V, Bronk P, Zimmerberg J. An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. *J. Cell Biol.* 1997;136:81–93.
45. Melikyan GB, Chernomordik LV. Membrane rearrangements in fusion mediated by viral proteins. *Trends. Microbiol.* 1997;5:349–355.
46. Chernomordik L, Leikina E, Cho MS, Zimmerberg J. Control of baculovirus gp64-induced syncytium formation by membrane lipid composition. *J. Virol.* 1995;69:3049–3058.
47. Wang X, Huang DY, Huong SM, Huang ES. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med.* 2005;11(5):515-21.
48. Fulkerson HL, Chesnokova LS, Kim JH, Mahmud J, Frazier LE, Chan GC, Yurochko AD. HCMV-induced signaling through gB-EGFR engagement is required for viral trafficking and nuclear translocation in primary human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(32):19507-19516.
49. Wang Q, Pan W, Wang S, Pan C, Ning H, Huang S, Chiu SH, Chen JL. Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 Suppresses Host Innate Immunity against

- Influenza A Virus by Regulating EGFR-Mediated Signaling. *J Virol.* 2021;95(6):e02001-20.
50. Raab-Traub N, Flynn K, Pearson G, Huang A, Levine P, Lanier A, Pagano J. The differentiated form of nasopharyngeal carcinoma contains Epstein-Barr virus DNA. *Int J Cancer.* 1987;39(1):25-9.
51. Kieff E, Liebowitz D. Epstein-Barr virus and its replication. *Virology.* 1990;2nd ed. 1889–1920.
52. Busson P, McCoy R, Sadler R, Gilligan K, Tursz T, Raab-Traub N. Consistent transcription of the Epstein-Barr virus LMP2 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol.* 1992;66(5):3257-62.
53. Hitt MM, Allday MJ, Hara T, Karran L, Jones MD, Busson P, Tursz T, Ernberg I, Griffin BE. EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J.* 1989;8(9):2639-51.
54. Miller WE, Earp HS, Raab-Traub N. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol.* 1995;69(7):4390-8.
55. Wang HB, Zhang H, Zhang JP, et al. Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Commun.* 2015;6:6240.
56. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular Therapy* 2009;14: 316–327.
57. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:87-112.
58. Zhang Y, El-Far M, Dupuy FP, Abdel-Hakeem MS, He Z, Procopio FA, Shi Y, Haddad EK, Ancuta P, Sekaly RP, Said EA. HCV RNA Activates APCs via TLR7/TLR8 While Virus Selectively Stimulates Macrophages Without Inducing Antiviral Responses. *Sci Rep.* 2016;6:29447.
59. Yamashita M, Chattopadhyay S, Fensterl V, Saikia P, Wetzel JL, Sen GC. Epidermal growth factor receptor is essential for Toll-like receptor 3 signaling. *Sci Signal.* 2012;5(233):ra50.

60. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783–801.
61. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11:373–84.
62. Smith TJ, Olsen NH, Cheng RH, Liu H, Chase ES, Lee WM, Leippe DM, Mosser AG, Rueckert RR, Baker TS. Structure of human rhinovirus complexed with Fab fragments from a neutralizing antibody. *J Virol*. 1993;67: 1148–1158.
63. Brioen P, Dekegel D, Boeye A. Neutralization of poliovirus by antibody-mediated polymerization. *Virology*. 1983;127: 463–468.
64. Thomas ADM, Brioen P, Boeye A. A monoclonal antibody that neutralizes poliovirus by cross-linking virions. *J Virol*. 1985;54: 7–13
65. Reading SA, Dimmock NJ. Neutralization of animal virus infectivity by antibody. *Arch Virol*. 2007;152(6):1047-59.
66. Brioen P, Rombaut B, Boeye A. Hit-and-run neutralization of poliovirus. *J Gen Virol*. 1985;66: 2495–2499.
67. Delaet I, Boeye A. Monoclonal antibodies that disrupt poliovirus only at fever temperatures. *J Virol*. 1993;67: 5299–5302.
68. Wohlfart C. Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms. *J Virol*. 1988;62: 2321–2328.
69. Wetz K, Willingmann P, Zeichhardt H, Habermehl K-O. Neutralization of poliovirus by polyclonal antibodies requires binding of a single IgG molecule per virion. *Arch Virol*. 1986;91: 207–220.
70. Flamand A, Raux H, Gaudin Y, Ruigrok RW. Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology*. 1993;194(1):302-13.
71. Taylor HP, Armstrong SJ, Dimmock NJ. Quantitative relationships between an influenza virus and neutralizing antibody. *Virology*. 1987;159: 288–298.
72. Colman PM. Virus versus antibody. *Structure*. 1997;5:591–593.
73. Smith TJ. Antibody interactions with rhinovirus: lessons for mechanisms of neutralization and the role of immunity in viral evolution. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001;260:1-28.

74. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:531–569.
75. Barbas CF III, Hu D, Dunlop N, Sawyer L, Cababa D, Hendry RM, Nara PL, Burton DR. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type I to enhance affinity and broaden strain specificity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91: 3809–3813.
76. Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev.* 2005;206:83-99.
77. Sheng X, Guo Y, Zhu H, Chai B, Tang X, Xing J, Chi H, Zhan W. Transepithelial Secretion of Mucosal IgM Mediated by Polymeric Immunoglobulin Receptor of Flounder (*Paralichthys olivaceus*): In-Vivo and In-Vitro Evidence. *Frontiers in Immunology.* 2022;13:1664-3224.
78. Wang GJ, Porta C, Chen ZG, Baker TS, Johnson JE. Identification of a Fab interaction footprint site on an icosahedral virus by cryoelectron microscopy and X-ray crystallography. *Nature.* 1992;355(6357):275-8.
79. Porta C, Spall VE, Loveland J, Johnson JE, Barker PJ, Lomonossoff GP. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology.* 1994;202(2):949-55.
80. Porta C, Wang G, Cheng H, Chen Z, Baker TS, Johnson JE. Direct imaging of interactions between an icosahedral virus and conjugate F(ab) fragments by cryoelectron microscopy and X-ray crystallography. *Virology.* 1994;204(2):777-88.
81. Wei H, Wang JY. Role of Polymeric Immunoglobulin Receptor in IgA and IgM Transcytosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2284.
82. Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, Frankenberger EA, Griffith JP, Hecht HJ, Johnson JE, Kamer G, Luo M, Mosser AG, et al. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature.* 1985;317(6033):145-53.
83. Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C, Desgranges C. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity.*

1998;9(2):277-87.

84. Parren PW, Burton DR. The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv Immunol.* 2001;77:195-262.

85. Kalinke U, Bucher EM, Ernst B, Oxenius A, Roost HP, Geley S, Kofler R, Zinkernagel RM, Hengartner H. The role of somatic mutation in the generation of the protective humoral immune response against vesicular stomatitis virus. *Immunity.* 1996;5(6):639-52.

86. Johnson RT, Mims GA. Pathogenesis for viral infections of the nervous system. *N Engl J Med.* 1968;278(2):84-92.

87. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science.* 1999;286(5447):2156-9.

88. Kabat EA. The molecular weight of antibodies. *J Exp Med.* 1939;69(1):103-18. doi: 10.1084/jem.69.1.103.

89. Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, et al. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature.* 1992;357(6377):417-420.

90. Hu W, Zhang S, Shen Y, Yang Q. Epidermal growth factor receptor is a co-factor for transmissible gastroenteritis virus entry. *Virology.* 2018;521:33-43.

91. Turlewicz-Podbielska H, Pomorska-Mól M. Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. *Virol Sin.* 2021;36(5):833-851.

92. Kreisberg JJ, Wilson PD. Renal cell culture. *J Electron Microsc Tech.* 1988;9(3):235-63.

93. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 2000;326:245-254.

94. Wokes F, Still BM. The estimation of protein by the biuret and Greenberg methods. *The Biochemical Journal.* 1942 Dec;36(10-12):797-806.

95.H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1):16-22.

96. Pogribna A, Grom M, Sokol I, Berestoviy V, Govsiev D. Both maternal and newborn IgMs inhibit influenza virus-induced hemagglutination in vitro.