

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

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

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТРАНСЛЯЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ  
ТА МЕТАБОЛІЧНОГО ПРОФІЛЮ В РІЗНИХ КЛІТИННИХ  
КОНТЕКСТАХ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студентки спеціальності 091  
Біологія (високі технології)

**Дімітрової Вероніки Вячеславівни**

Науковий керівник від кафедри  
д.б.н. **Данилович Юрій Володимирович**

Робота виконана в науковій лабораторії «Stem Cell Dynamics & Mitochondrial Genomics» при Берлінському Інституті здоров'я/Шаріте, Німеччина, Берлін під керівництвом д.-р., д-р. **Ляйфа Людвіга** (dr. dr. Leif Ludwig)

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2024 р.**

## АНОТАЦІЯ

Дімітрова В.В Кількісне визначення здатності до трансляції та метаболічного профілю в різних клітинних контекстах. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія.

У цій роботі було валідовано одночасне кількісне визначення потенціалу трансляції та метаболічного профілювання за допомогою методу SCENITH на мононуклеарних клітинах периферичної крові. Також досліджено інтенсивність трансляції та метаболічні профілі Т-клітин під час активації. Крім того, аналіз SCENITH застосовано до адгезійних клітинних ліній здорових донорів за різних умов середовища.

Було виявлено, що SCENITH ефективно розпізнає відомі метаболічні стани субпопуляцій Т-клітин та метаболічний зсув у бік гліколізу в активованих Т-клітинах. НЕК клітини показали мінімальну залежність від окислювального фосфорилування (OXPHOS), а дермальні фібробласти демонстрували чіткі метаболічні адаптації при різних умовах культивування.

Отримані результати продемонстрували відтворюваність аналізу SCENITH, встановлюючи базовий рівень метаболічної активності в генетично незмінених клітинах. Ці результати можуть бути застосовані для вивчення метаболічних переваг зразків пацієнтів з мітохондріальними мутаціями. В подальшому, цей метод буде поєднано з відомими методами секвенування.

**Ключові слова:** трансляційна здатність, метаболічний стан, проточна цитометрія, пуроміцин, метаболічна динаміка, Т-клітини.

## ANNOTATION

Dimitrova V.V., QUANTIFYING TRANSLATION CAPACITY AND METABOLIC PROFILES ACROSS DIVERSE CELLULAR CONTEXTS. Bachelor's thesis in 091 Biology.

In this work, it was validated the simultaneous quantification of translation capacity (TC) and metabolic profiling (MP) using the SCENITH method on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). SCENITH assay was conducted in T cells under different activation time points. Additionally, the SCENITH assay was applied to adherent cell lines from healthy donors under different medium conditions.

It was found that the established SCENITH assay effectively resolved known metabolic states of T cell compartments. T cell activation SCENITH assay detected metabolic shift towards glycolysis in T cells expanded and activated in vitro. Moreover, it was observed that HEK cells showed minimal reliance on oxidative phosphorylation (OXPHOS) in our setup. Human Dermal Fibroblasts exhibited distinct metabolic adaptations under different culture conditions.

The obtained results demonstrated the reproducibility and validation of the SCENITH assay, establishing a baseline for metabolic activities in genetically unaltered cell tissues. These findings can be further applied to study the metabolic preferences of patient samples with known mitochondrial mutations. Additionally, this methods aimed to be further implemented into sequencing-based methods.

**Key words:** translational capacity, metabolic capacity, flow cytometry, puromycin, metabolic dynamic, T cells.

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| <b>РОЗДІЛ 1</b> .....   | 8  |
| <b>ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....   | 8  |
| 1.1 Значення білкового синтезу для функціонування клітин .....  | 8  |
| 1.2 Необхідність у точному вимірюванні трансляційної здатності білків та клітинного метаболізму ..... | 8  |
| 1.4. Основи білкового синтезу та клітинного метаболізму .....   | 10 |
| 1.4.1 Центральна догма молекулярної біології .....  | 10 |
| 1.4.2 Клітинний метаболізм .....  | 11 |
| 1.4.3 Інгібітори основних шляхів метаболізму .....  | 20 |
| 1.3 Сучасні методики вимірювання рівня трансляції білків та метаболічного профілю .....               | 22 |
| 1.3.1 Методи SCENITH та SUNSET .....  | 25 |
| <b>РОЗДІЛ 2</b> .....   | 29 |
| <b>МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ</b> .....  | 29 |
| 2.1. Матеріали .....  | 29 |
| 2.1.1. Клітини .....  | 29 |
| 2.1.2. Склад поживних середовищ .....   | 29 |
| 2.1.3. Реагенти та розчинники .....   | 29 |
| 2.1.4. Антибіотики .....  | 30 |
| 2.2. Методи .....   | 32 |
| 2.2.1. Клітини та підтримання клітинних ліній .....   | 32 |
| 2.2.2. Активація Т клітин та SCENITH .....  | 33 |
| 2.2.3. протокол SCENITH .....   | 33 |

|  |    |
|--|----|
|  | 5  |
| 2.2.4. Проточна цитометрія .....   | 34 |
| <b>РОЗДІЛ 3</b> .....  | 37 |
| <b>РЕЗУЛЬТАТИ</b> .....  | 37 |
| 3.1. Тестування опублікованого методу SCENITH на Мононуклеарних Клітинах Периферичної Крові..... | 37 |
| 3.2. Метод SCENITH на НЕК-293 (ембріональні клітини нирки людини 293).....                       | 42 |
| 3.3. Метод SCENITH на фібробластах.....  | 45 |
| 3.4. Трансляційна здатність та метаболічний профіль Т клітин під час активації .....             | 48 |
| 3.5. Наступні кроки .....  | 52 |
| <b>ВИСНОВКИ</b> .....  | 53 |
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....  | 54 |

## ВСТУП

### Актуальність

Синтез протеїнів в клітинах ссавців вимагає значних енергетичних витрат, споживаючи приблизно половину всієї енергії, що утворюється в результаті катаболізму глюкози, амінокислот і ліпідів [13,40]. Існує тісний взаємозв'язок між клітинним метаболізмом і трансляційною здатністю, що зумовлює необхідність їх одночасного вивчення для більш повного розуміння енергетичного забезпечення функціонування клітин, зокрема імунної системи. Наразі недостатньо досконалими є наявні методи оцінювання інтенсивності трансляції та її зв'язку з метаболічною активністю клітин, що обмежує наше розуміння забезпечення адекватної імунної відповіді. Перспективним для вирішення зазначеної проблеми є використання і вдосконалення методу SCENITH, який надає детальну інформацію про метаболічний стан клітин (метаболон) та їхню транслуючу здатність (протеом). Це особливо актуально в контексті впливу фармпрепаратів на клітинні системи, розуміння контролю активності генів, вивчення механізмів рохвитку клітинного стресу та з'ясування причин та наслідків мітохондрійних хвороб.

**Мета дослідження.** Із використанням методу SCENITH дослідити швидкість синтезу білку та з'ясувати зв'язок інтенсивності трансляції із рівнем загального метаболізму та функціональною активністю в імунокомпетентних клітинах, фібробластах та лінії клітин НЕК-293.

У відповідності до мети були сформульовані **наступні завдання:**

1. Розробити експериментальні підходи для кількісної оцінки інтенсивності трансляції та ефективності протікання метаболічних процесів на основі методу SCENITH в мононуклеарних клітинах периферійної крові.
2. Застосувати метод SCENITH для аналізу протеому та метаболону в адгезивних клітинних лініях, включаючи клітини НЕК-293 та фібробласти.

3. Дослідити інтенсивність трансляції, метаболічні та енергетичні особливості Т-клітин за їхньої активації із застосуванням методу SCENITH.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Значення білкового синтезу для функціонування клітин

Синтез білка є завершальним етапом центральної догми молекулярної біології - фундаментальної концепції, яка описує, як генетична інформація, закодована у вигляді послідовностей ДНК, передається в ході транскрипції в інформаційну РНК (мРНК), а потім транлюється рибосомами у вигляді амінокислотних послідовностей, які утворюють білки. У цьому процесі центральна догма визначає основний процес синтезу білка, пов'язуючи генетичну інформацію з біохімічними процесами, які підтримують клітинне життя, такими як ферментативний каталіз, транспорт молекул, структурна організація, передача сигналів, імунний захист, скорочення м'язів і зберігання поживних речовин. Ці різноманітні ролі білків є центральними для клітинних процесів, що підкреслює важливість розуміння синтезу білків у широкому спектрі клітинних і фізіологічних функцій.

Ефективність синтезу білка тісно пов'язана з клітинним метаболізмом, оскільки біосинтез білків вимагає значної кількості енергії, насамперед у формі АТФ, і субстратів, як, наприклад, амінокислот, які надходять з метаболічних шляхів [41]. Цей взаємозв'язок підкреслює, що синтез білка тісно пов'язаний з метаболізмом, підкреслюючи важливий баланс між генетичною експресією та метаболічною здатністю.

#### 1.2 Необхідність у точному вимірюванні трансляційної здатності білків та клітинного метаболізму

Синтез білка в клітинах ссавців вимагає значних енергетичних витрат, споживаючи близько половини загальної енергії, отриманої в результаті катаболізму глюкози, амінокислот і ліпідів [13,40]. Тісний зв'язок між

клітинним метаболізмом і здатністю до трансляції зумовлює необхідність їх одночасного вивчення для повного розуміння клітинної енергетики та функції. Одним із застосувань таких досліджень є оцінка впливу ліків на клітинні системи. Дослідники можуть з'ясувати вплив ліків на ці фундаментальні процеси. Цей підхід також важливий для розуміння інших аспектів клітинних функцій, таких як регуляція генної активності, реакція на стрес і наслідки захворювань, пов'язаних з мітохондріальними мутаціями.

## 1.4. Основи білкового синтезу та клітинного метаболізму

### 1.4.1 Центральна догма молекулярної біології

Центральна догма молекулярної біології, описана Уотсоном і Кріком, окреслює процес передачі генетичної інформації в живих організмах від ДНК до РНК і білка. Цей фундаментальний процес відбувається в усіх клітинних організмах і характеризується двома основними етапами: транскрипцією та трансляцією [43, 45].

Транскрипція - це процес, за допомогою якого РНК синтезується на основі матриці ДНК, ефективно перетворюючи генетичні послідовності в формат, придатний для зчитування і синтезу білка. Цей процес регулюється клітиною відповідно до її поточних потреб, причому ключову роль відіграє РНК-полімераза, яка каталізує утворення РНК і розкручує спіраль ДНК, відкриваючи матричний ланцюг для комплементарного зчеплення з основою. Цей етап є особливо енергоємним, оскільки рибонуклеозидтрифосфати (АТФ, ЦТФ, УТФ і ГТФ) використовуються і як субстрати, і як джерела енергії, що вказує на значні метаболічні ресурси, призначені для транскрипції.

Після транскрипції еукаріотичні пре-мРНК проходять кілька етапів процесингу, включаючи сплайсинг, 5'-кепінг та 3'-поліаденілювання. Сплайсинг, опосередкований малими ядерними нуклеопротейнами, видаляє інтрони і зшиває екзони, потенційно в різних комбінаціях, що дозволяє одному гену кодувати кілька білків. Ці етапи процесингу є невід'ємною частиною підготовки пре-мРНК до трансляції, що ще більше підкреслює складні енергетичні вимоги до експресії генів [45].

Трансляція мРНК у білок відбувається за допомогою рибосом у цитоплазмі. Тут послідовність нуклеотидів мРНК транлюється в поліпептидний ланцюг, а кодони - набори з трьох нуклеотидів - диктують послідовність амінокислот. Процес трансляції починається з кодону АУГ і завершується після досягнення стоп-кодону (УАА, УАГ, УГА), при цьому

рРНК у рибосомі діє як рибозим, що каталізує утворення пептидних зв'язків. тРНК виконують роль адаптерів, підбираючи амінокислоти до кодонів за допомогою аміноацил-тРНК-синтетаз [44].

Рівень білка в клітині - це баланс між його синтезом і деградацією. Білки, які більше не потрібні, розщеплюються протеасомами, що свідчить про регульований підхід до підтримання рівня білків у клітині.

Синтез білків, від транскрипції до трансляції, нерозривно пов'язаний з клітинним метаболізмом, що вимагає значних енергетичних витрат. Синтез білків не тільки споживає значну частину клітинного АТФ, але й потребує безперервного постачання амінокислот, що підкреслює глибокий зв'язок між метаболічним станом клітини та її здатністю до трансляції. Ця взаємозалежність підкреслює необхідність вивчення синтезу білка в контексті клітинного метаболізму для повного розуміння клітинної енергетики та функцій.

#### **1.4.2 Клітинний метаболізм**

Клітинний метаболізм охоплює складну мережу хімічних реакцій, які відбуваються в клітинах для підтримання життя (рисунок 1.4.1). Ці метаболічні шляхи відповідають за перетворення поживних речовин в енергію, побудову клітинних компонентів та виведення відходів. Завдяки таким процесам, як гліколіз, цикл трикарбонових кислот та окисного фосфорилування, клітини ефективно керують утворенням та використанням енергії, забезпечуючи ріст, розмноження та реакцію на зміни навколишнього середовища.

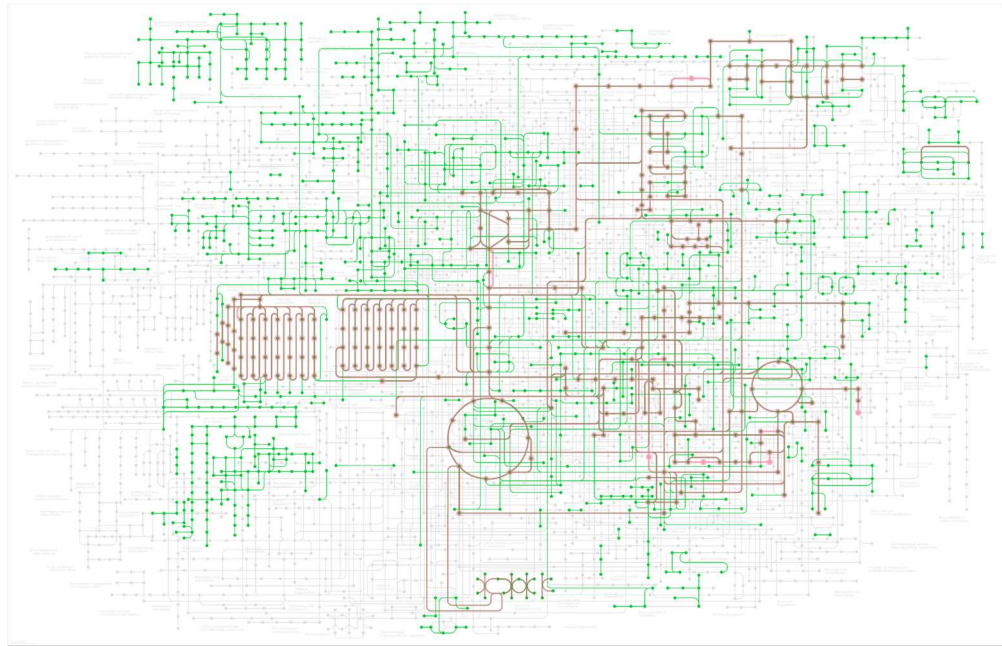


Рисунок 1.4.2.1 – Оглядове зображення метаболічних шляхів. Рисунок взято з онлайн-бази даних KEGG (Київська енциклопедія генів і геномів) PATHWAY.

### Гліколіз

Гліколіз - це центральний метаболічний шлях, що відбувається в цитоплазмі майже всіх живих клітин, як прокаріотичних, так і еукаріотичних. Він включає розщеплення глюкози, яка надходить з крові або з продуктів живлення.

Гліколіз починається з фосфорилування глюкози з утворенням глюкозо-6-фосфату (G6P), що каталізується гексокіназою і потребує АТФ. Цей етап забезпечує утримання глюкози в клітині. Потім G6P метаболізується до фруктозо-6-фосфату, а потім фосфорилується з утворенням фруктозо-1,6-бісфосфату, який розщеплюється на дигідроксиацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат. Ці проміжні продукти перетворюються на піруват, утворюючи АТФ і відновлюючи  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH}$ .

Доля пірувату залежить від наявності кисню. У присутності  $\text{O}_2$  піруват перетворюється в мітохондріях на ацетил КоА, який входить у цикл лимонної

кислоти для подальшого виробництва енергії. Без O<sub>2</sub> піруват перетворюється на молочну кислоту, утилізуючи NAD<sup>+</sup> для продовження гліколізу в анаеробних умовах. Піруват також може використовуватися в глюконеогенезі для підтримання рівня глюкози в крові під час голодування або важких фізичних навантажень.

В результаті гліколізу утворюється дві молекули АТФ на молекулу глюкози, а дві додаткові молекули АТФ витрачаються ще на ранніх етапах гліколізу. Крім того, з кожної молекули глюкози утворюється дві молекули NADH, які можуть генерувати більше АТФ шляхом окисного фосфорилування в аеробних умовах.

Ракові клітини часто віддають перевагу синтезу лактату з глюкози навіть у присутності кисню, що називається ефектом Варбурга. Це сприяє швидкому росту та виживанню клітин, оминаючи більш енергоефективне окислювальне фосфорилування [19, 20, 21, 22]. Транспорт пірувату в мітохондрії опосередковується мітохондріальним переносником пірувату (MPC), і його інгібування може змістити метаболізм у бік гліколізу навіть при достатній кількості кисню. Цей зсув посилює ріст і виживання ракових клітин. Ферменти, такі як піруватдегідрогеназний комплекс (PDC) та піруваткарбоксилаза (PC), також впливають на те, чи піруват бере участь у циклі трикарбонових кислот для виробництва енергії, чи у синтетичних шляхах формування та відновлення клітин [31].

### **Глюконеогенез, глікогеноліз, and глікогенез**

Глюконеогенез - це процес синтезу глюкози з неуглеводних джерел, таких як лактат, піруват, амінокислоти та жирні кислоти. Цей шлях має вирішальне значення для підтримання оптимального рівня глюкози в крові, особливо з огляду на те, що багато важливих органів, включаючи мозок, отримують енергію виключно з глюкози. У періоди низького рівня глюкози в

крові, наприклад, під час голодування, голодування та низьковуглеводних дієт, гліюконеогенез відбувається переважно в печінці.

З іншого боку, гліюгеноліз - це розщеплення гліюгену до гліюкози, тоді як гліюгенез - це утворення гліюгену з гліюкози. Гліюген зберігається в гепатоцитах і м'язових клітинах і служить легкодоступним енергетичним резервом. Як гліюгеноліз, так і гліюгенез жорстко регулюються гормональними та нейронними сигналами. Наприклад, гліюкагон та адреналін запускають гліюгеноліз, сприяючи вивільненню гліюкози в кров. Натомість інсулін стимулює гліюгенез, полегшуючи зберігання надлишку гліюкози у вигляді гліюгену, коли рівень гліюкози в крові та АТФ є достатнім. Ці процеси забезпечують збалансоване постачання гліюкози залежно від енергетичних потреб організму[17, 18].

### **Окислення жирних кислот**

Окислення жирних кислот, також відоме як бета-окислення, - це важливий метаболічний процес, під час якого жирні кислоти розщеплюються в мітохондріях і пероксисомах з утворенням ацетил-КоА. Цей ацетил-КоА вступає в цикл лимонної кислоти для виробництва АТФ, необхідного для вироблення енергії під час голодування або інтенсивних фізичних навантажень, коли рівень гліюкози низький.

Усередині клітин жирні кислоти повинні бути активовані, перш ніж потрапити до мітохондрій. Ацил-КоА-синтетаза перетворює жирні кислоти на ацил-КоА. Активованій жирний ацил-КоА транспортується в мітохондрії за допомогою карнітинового човника (carnitine shuttle), в якому беруть участь карнітин-ацилтрансфераза I на зовнішній мембрані мітохондрій і карнітин-ацилтрансфераза II на внутрішній мембрані мітохондрій [28].

На першому етапі бета-окислення жирний ацил-КоА окиснюється ацил-КоА дегідрогеназою з утворенням транс-алкєну, за допомогою протеїнової групи FAD. Після цього еноіл-КоА-гідратаза гідратує транс-алкєн,

перетворюючи його на гідроксиацил-КоА. Далі гідроксиацил-КоА дегідрогеназа окиснює гідроксиацил-КоА за допомогою  $\text{NAD}^+$ , утворюючи карбонільну сполуку. Нарешті, тіолаза відщеплює ацетил-КоА від жирного ацил-КоА, вкорочуючи ацильний ланцюг на два вуглеці.

На другому етапі, ацетил-КоА, що утворюється в результаті бета-окислення, далі окислюється до  $\text{CO}_2$  в циклі трикарбонних кислот. Енергія, отримана в результаті окислення жирних кислот, відновлюється у вигляді АТФ шляхом окисного фосфорилування.

Регуляція цього процесу має вирішальне значення. Малоніл-КоА інгібує карнітин-ацилтрансферазу I, запобігаючи потраплянню жирних кислот у мітохондрії і тим самим блокуючи розщеплення жирних кислот під час синтезу. Генетичні дефекти у ланцюгу ацил-КоА-дегідрогенази та інших компонентів системи  $\beta$ -окислення можуть спричиняти серйозні захворювання [28, 29].

### **Окиснювання амінокислот**

Амінокислоти піддаються окислювальній деградації у тварин за трьох основних умов: під час нормального білкового обміну, коли споживання білка з їжею перевищує потреби організму, а також під час голодування або неконтрольованого цукрового діабету, коли інші джерела недоступні [15, 17].

Люди отримують невелику частину окислювальної енергії від катаболізму амінокислот. Ця енергія надходить від розщеплення клітинних білків, білків, що надходять з їжею, і білків тіла під час дефіциту інших речовин. Протеази в шлунку і тонкому кишечнику розщеплюють спожиті білки.

На ранньому етапі катаболізму амінокислот відбувається відщеплення аміногрупи від вуглецевого скелета. Аміногрупа переноситься до  $\alpha$ -кетоглутарату з утворенням глутамату в реакції трансамінування, для якої потрібен піридоксальфосфат. Потім глутамат транспортується до мітохондрій

печінки, де глутаматдегідрогеназа вивільняє аміногрупу у вигляді іона амонію ( $\text{NH}_4^+$ ). Аміак з інших тканин транспортується до печінки у вигляді азоту амідну глутаміну або аміногрупи аланіну зі скелетних м'язів. У печінці аланін дезамінується з утворенням пірувату, який перетворюється на глюкозу і повертається в м'язи через глюкозо-аланіновий цикл [16].

Після видалення аміногруп вуглецеві скелети амінокислот окислюються до сполук, які вступають у цикл лимонної кислоти. Цей процес потребує кофакторів, таких як тетрагідрофолат, S-аденозилметіонін і тетрагідробіоптерин. Залежно від кінцевих продуктів деградації, амінокислоти перетворюються на кетоніві тіла, глюкозу або обидва ці продукти, інтегруючись у проміжний метаболізм [19].

Вуглецеві скелети входять до циклу лимонної кислоти через проміжні продукти, такі як ацетил-КоА,  $\alpha$ -кетоглутарат, сукциніл-КоА, фумарат та оксалоацетат. Деякі з них деградують до пірувату, який може бути перетворений на ацетил-КоА або оксалоацетат.

Амінокислоти, що утворюють піруват, включають аланін, цистеїн, гліцин, серин, треонін і триптофан. До амінокислот, що утворюють ацетил-КоА через ацетоацетил-КоА, належать лейцин, лізин, фенілаланін і триптофан. Амінокислоти, що утворюють ацетил-КоА безпосередньо, - це ізолейцин, лейцин, треонін і триптофан. Амінокислоти, що утворюють  $\alpha$ -кетоглутарат, включають аргінін, глутамат, глутамін, гістидин і пролін. До амінокислот, що утворюють сукциніл-КоА, належать ізолейцин, метіонін, треонін і валін. Амінокислоти, що утворюють фумарат, включають фенілаланін і тирозин. До амінокислот, що утворюють оксалоацетат, належать аспарагін та аспартат. Амінокислоти з розгалуженим ланцюгом - ізолейцин, лейцин і валін - унікально деградують у позапечінкових тканинах [26].

Кілька серйозних захворювань людини пов'язані з генетичними дефектами ферментів, що беруть участь у катаболізмі амінокислот [27].

## **Цикл Кребса, електронний транспортний ланцюг та окисне фосфорилування**

Цикл Кребса, також відомий як цикл лимонної кислоти або цикл трикарбонових кислот (ТБК), є центральним метаболічним шляхом, який відіграє вирішальну роль у клітинному диханні. Цикл починається, коли ацетил КоА з'єднується з чотиривуглецевою молекулою, оксалоацетатом, і утворює шестивуглецеву молекулу, яка називається цитрат або лимонна кислота. Цей процес є важливим, оскільки він запускає циклічну серію реакцій, які генерують високоенергетичні молекули. Цитрат проходить ряд перетворень, в результаті чого відновлюється оксалоацетат, який дозволяє продовжити цикл за участю іншої молекули ацетил-КоА [23, 24].

**Під час циклу Кребса** перетворення цитрату назад в оксалоацетат супроводжується вивільненням двох молекул CO<sub>2</sub>. Кожен цикл генерує одну молекулу АТФ (або ГТФ), три молекули NADH і одну молекулу FADH<sub>2</sub>. Ці високоенергетичні переносники електронів, NADH і FADH<sub>2</sub>, потім утилізуються в системі окисного фосфорилування, розташованій у внутрішній мембрані мітохондрій. Сам цикл є ключовою частиною клітинного метаболізму, оскільки він забезпечує необхідні електрони і протони для електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ).

Електронний транспортний ланцюг, критичний компонент окислювального фосфорилування, складається з серії білкових комплексів (комплекси I-IV) і двох мобільних переносників електронів (коензим Q і цитохром C), вбудованих у внутрішню мітохондріальну мембрану. Основна функція ЕТЛ полягає в перенесенні електронів від донорів електронів, таких як NADH і FADH<sub>2</sub>, до кисню, кінцевого акцептора електронів. Це перенесення електронів супроводжується перекачуванням протонів (H<sup>+</sup>) з мітохондріального матриксу в міжмембранний простір, створюючи градієнт протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану [25].

Коли електрони проходять через ЕТЛ, вони переходять з вищих енергетичних станів у нижчі, вивільняючи енергію на кожному кроці. Ця енергія використовується для перекачування протонів через мембрану в трьох ключових точках: Комплекси I, III і IV. Градієнт протонів, що виникає в результаті, створює різницю потенціалів на мембрані, яку часто називають рушійною силою протонів. Ця сила керує синтезом АТФ з АДФ і неорганічного фосфату (Pi) за допомогою ферменту АТФ-синтази, розташованого у внутрішній мембрані мітохондрій.

Весь процес окисного фосфорилування, від передачі електронів до утворення АТФ, має вирішальне значення для ефективного вироблення клітинної енергії. На кожную молекулу NADH, яка віддає електрони до ЕТЛ, виробляється приблизно три молекули АТФ. На кожную молекулу FADH<sub>2</sub>, яка потрапляє в ЕТЛ через комплекс II, а не через комплекс I, утворюється приблизно дві молекули АТФ. Загалом, під час окисного фосфорилування утворюється близько 34 молекул АТФ на молекулу глюкози, які утворюються з 10 NADH і 2 FADH<sub>2</sub>, що утворюються під час гліколізу, піруватдегідрогеназної реакції та циклу Кребса.

Крім того, розуміння регуляції та інтеграції цих метаболічних шляхів має вирішальне значення для розуміння того, як клітини адаптуються до різних фізіологічних умов. Клітини адаптують свій метаболізм залежно від фізіологічних умов. В умовах гіпоксії або інтенсивних фізичних навантажень клітини можуть переорієнтуватися на гліколіз і вироблення лактату. На противагу цьому, ракові клітини часто демонструють ефект Варбурга, коли вони переважно виробляють лактат з глюкози навіть у присутності достатньої кількості кисню [19, 20].

**Мутації в мітохондріальній ДНК** можуть суттєво впливати на метаболічні процеси, оскільки мітохондрії відіграють центральну роль у виробництві клітинної енергії. Ці мутації можуть порушувати дихальний

ланцюг, що призводить до метаболічних розладів. Невелика частина мітохондріальних білків кодується мітохондріальним геномом і синтезується в мітохондріях, тоді як більшість кодується ядерними генами і імпортується в мітохондрії. Мутації в генах, що кодують компоненти дихального ланцюга, можуть призводити до різних захворювань людини, часто вражаючи м'язи та мозок через їхні високі енергетичні потреби [34].

Мітохондріальний геном людини - це невелике кільце розміром 16,6 кб, що містить лише 37 генів: 13 з них кодують білки, а решта 24, що складаються з 2 рибосомальних РНК (рРНК) і 22 тРНК, використовуються для трансляції цих 13 поліпептидів [47]. Цікаво, що всі 13 поліпептидів є компонентами одного метаболічного об'єкта - системи ОХРНOS. Патогенні мутації, що призводять до дефіциту дихального ланцюга, можуть виникати внаслідок мутацій в обох геномах [46]. Окрім цих структурних субодиниць, існує понад 50 нДНК-кодованих продуктів допоміжних генів, необхідних для правильної збірки та функціонування системи ОХРНOS. Хоча мітохондріальні порушення ОХРНOS досить різноманітні, вони, як правило, мають ряд «канонічних» біохімічних і морфологічних ознак. Первинні захворювання, пов'язані з мтДНК, можна визначити як такі, що виникають безпосередньо внаслідок мутації в мтДНК - або точкової мутації, або перебудови ДНК (тобто делеції, дуплікації або інверсії), - яка безпосередньо порушує функцію ОХРНOS.

Приклади найпоширеніший точкових мутацій в мтДНК ж: транзиція А→G в положенні 3 243 в гені tRNA<sup>Leu</sup>(UUR), що викликає мітохондріальну енцефалопатію, молочнокислий ацидоз та інсультподібні епізоди (MELAS); транзиція А→G в положенні 8 344 в гені tRNA<sup>Lys</sup>, що викликає міоклонусну епілепсію та синдром обірваних червоних волокон (MERRF); та вищезгадана транзиція Т→G в положенні 8 993 в гені АТР6, що викликає NARP і MILS.

Масштабні часткові делеції мтДНК включають видалення приблизно 2-10 кб мтДНК, причому точки розриву часто фланкуються короткими прямими повторами. Ці делеції зазвичай виникають спорадично і призводять до трьох

патогенетично подібних розладів: Синдром Кернса-Сайра (KSS) [48], що характеризується м'язовою слабкістю та серцевою блокадою; хронічна прогресуюча зовнішня офтальмоплегія (СРЕО) [49], що характеризується прогресуючою слабкістю очних м'язів; і синдром Пірсона [50], який в першу чергу вражає кістковий мозок і підшлункову залозу.

### **1.4.3 Інгібітори основних шляхів метаболізму**

У клітинній біології інгібітори метаболізму відіграють вирішальну роль у порушенні нормальних клітинних функцій та метаболічних процесів. Вони є важливими інструментами, які можуть цілеспрямовано впливати на різні ферменти або шляхи та інгібувати їх, що призводить до зміни клітинного метаболізму. Таким чином, дослідники можуть отримати уявлення про основні функції та регуляторні механізми метаболічних процесів у клітині.

Більше того, використання інгібіторів метаболізму виходить за рамки фундаментальних досліджень. У клінічному контексті ці інгібітори можуть слугувати терапевтичними засобами, спрямованими на метаболічні шляхи, які порушуються при таких захворюваннях, як рак, діабет та метаболічні розлади. Наприклад, метформін, поширений препарат від діабету, пригнічує мітохондріальну гліцерофосфатдегідрогеназу, зменшуючи печінковий гліюконеогенез і допомагаючи контролювати рівень цукру в крові [32]. У дослідженнях раку інгібітори, такі як 2-дезоксид-Д-глюкоза, порушують гліколіз, тим самим позбавляючи ракові клітини глюкози, необхідної їм для швидкого росту [33]. Модулюючи метаболічні шляхи, можна розробити цілеспрямовану терапію, яка може полегшити симптоми або навіть виправити метаболічний дисбаланс. У наступній таблиці перераховані різні інгібітори основних шляхів клітинного метаболізму із зазначенням їхніх мішеней і способів дії.

Таблиця 1.4.3.1 – Інгібітори головних шляхів метаболізму

| Метаболічний шлях           | Інгібітор             | Ціль/Механізм дії  |
|-----------------------------|-----------------------|--|
| Гліколіз                    | 2-Деокси-D-глюкоза    | Інгібує гексокіназу, що призводить до накопичення 2-дезоксиглюкозо-6-фосфату |
|                             | Йодоацетат            | Інгібує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу                                 |
| Цикл лимонної кислоти       | Фтороацетат           | Перетворюється у фтороцитрат, який інгібує аконітазу                         |
|                             | Малонат               | Конкурентний інгібітор сукцинатдегідрогенази                                 |
| Окислювальне фосфорилування | Олігоміцин            | Інгібує АТФ-синтазу (F <sub>0</sub> компонент)                               |
|                             | Ціанід                | Інгібує цитохром с оксидазу (Комплекс IV)                                    |
|                             | Чадний газ            | Інгібує цитохром с оксидазу (Комплекс IV)                                    |
|                             | Ротенон               | Інгібує NADH-дегідрогеназу (Комплекс I)                                      |
|                             | Антиміцин А           | Інгібує цитохром bc <sub>1</sub> комплекс (Комплекс III)                     |
| Пентозофосфатний шлях       | 6- 6-Амінонікотинамід | Інгібує глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу  |
| Окиснення жирних кислот     | Етомоксир             | Інгібує карнітин пальмітоїлтрансферазу I (CPT-1)                             |
|                             | Триметазидин          | Інгібує довголанцюгову 3-кетоацил-КоА тіолазу                                |

|               |  |  |
|---------------|--|--|
| Глюконеогенез | Метформін                                  | Інгібує мітохондріальну гліцерофосфатдегідрогеназу |
|               | 3-Меркаптопіколінова кислота               | Інгібує фосфоенолпіруваткарбоксікіназу (PEPCK)     |
| Глікогеноліз  | 1,4-Дідезокси-1,4-іміно-D-арабінітол (DAB) | Інгібує глікогенфосфорилазу                        |
| Синтез білка  | Циклогексимід                              | Інгібує еукаріотичні рибосоми                      |

### 1.3 Сучасні методи вимірювання рівня трансляції білків та метаболічного профілю

У галузі клітинної біології точне вимірювання білкової трансляції та метаболічних профілів має вирішальне значення для розуміння різних аспектів клітинної функції та регуляції. Ця робота спрямована застосування методів вимірювання цих параметрів, з особливим акцентом на метод SCENITH. Однак SCENITH - не єдиний метод, доступний для таких вимірювань. Для вивчення синтезу білка та клітинного метаболізму розроблено безліч методів, кожен з яких має свої переваги та обмеження.

Традиційно вимірювання синтезу білка проводили без урахування специфічних відмінностей між типами клітин, що ускладнювало вивчення рідкісних типів клітин, які неможливо підтримувати в умовах *in vitro*. **Радіоактивне мічення амінокислот**, наприклад, включення [<sup>35</sup>S]-метіоніну в клітинні білки, є часто використовуваним методом. Цей підхід дозволяє кількісно оцінити синтез білка *in vivo*, без необхідності генетичних модифікацій, якщо тільки штам не потребує добавки метіоніну через ауксотрофність. Незважаючи на свою ефективність, цей метод має певні

обмеження через складність користування з радіоактивними матеріалами та необхідністю ізоляції типів клітин, що може ускладнити користування з гетерогенними популяціями клітин [2, 3].

**FUNCAT (флуоресцентне мічення неканонічних амінокислот).** Методика, як FUNCAT (флуоресцентне мічення неканонічних амінокислот), використовує неканонічні амінокислоти, такі як азидогомоаланін (АНА) або гомопротаргілгліцин (HPG), для мічення новосинтезованих білків, які потім виявляються за допомогою флуоресцентних маркерів за допомогою клік-хімії. Цей метод особливо корисний для візуалізації синтезу білків у певних клітинних ділянках, але обмежений неможливістю застосування аналогів метіоніну та складністю хімічних реакцій, що беруть участь у ньому [4].

**BONCAT (біоортогональне неканонічне амінокислотне мічення)** використовує схожий принцип, застосовуючи АНА-марковані білки та мідно-каталізовану клік-хімію для їх виявлення та очищення [5, 6]. Хоча BONCAT покращує виявлення новосинтезованих білків, він може мати труднощі з виявленням білків, синтезованих на дуже низьких рівнях або тих, що неефективно мічені за допомогою АНА.

**QuaNCAT (кількісне неканонічне амінокислотне мічення)** поєднує неканонічне амінокислотне мічення зі стабільним ізотопним маркуванням для вимірювання синтезу білків [7]. Цей метод передбачає включення АНА у новосинтезовані білки, які потім виявляються та кількісно визначаються за допомогою мас-спектрометрії. QuaNCAT вирішує деякі обмеження традиційних методів, таких як SILAC, дозволяючи більш детальний аналіз динаміки білків у первинних клітинах, хоча він вимагає достатньої кількості клітин і метіонін-вільних умов, що ускладнює його застосування *in vivo*.

#### **OP-Puro.**

OP-Puro - це метод, розроблений для подолання обмежень вимірювання синтезу білка в рідкісних типах клітин, які неможливо підтримувати *in vitro*, таких як соматичні стовбурові клітини [8, 9]. Цей метод передбачає

використання OP-Puro, аналога пуроміцину, для мічення нових поліпептидних ланцюгів під час трансляції. OP-Puro має кінцеву алкільну групу, що дозволяє йому імітувати аміноацил-тРНК та інтегруватися в нові поліпептидні ланцюги під час трансляції, ефективно зупиняючи процес елонгації. Після включення в білок OP-Puro можна виявити за допомогою реакції клік-хімії, а саме циклоприєднання азид-алкіну, яке ковалентно зв'язує його з флуоресцентно міченим азидом. Це дозволяє безпосередньо вводити OP-Puro клітинам у культурах тканин, цілим тканинам або навіть цілим організмам, наприклад, мишам. Вже через годину після введення клітини можна збирати і оцінювати рівень синтезу білка за допомогою флуоресцентної мікроскопії або кількісно визначати за допомогою проточної цитофлуориметрії, виходячи з кількості OP-Puro, що потрапила в клітину. Цей метод є цінним інструментом для вивчення синтезу білка в різних біологічних контекстах і в різних типах клітин.

**SUnSET.** Метод SUnSET дозволяє відстежувати та кількісно оцінювати синтез білка в окремих клітинах і в різних клітинних популяціях. Він використовує пуроміцин (рисунок 1), антибіотик, який нагадує аміноацильні тРНК, щоб порушити елонгацію білка, вбудовуючись у поліпептидні ланцюги, що формуються. При використанні в невеликих кількостях це включення відображає швидкість трансляції мРНК. Цей метод виявився практичною альтернативою радіоактивному міченню і дозволяє проводити пряму оцінку синтезу білка. Він ефективний для аналізу активності трансляції в окремих клітинах за допомогою імунофлуоресценції та в гетерогенних популяціях за допомогою проточної цитометрії (FACS) [10,11].

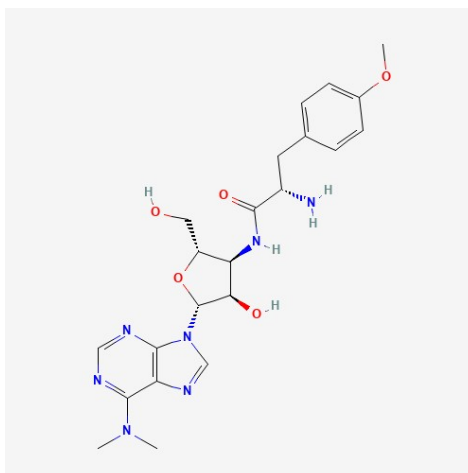


Рисунок 1.4.1.2 Структура пуроміцину. Рисунок взято з сайту PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Puromycin>

**PUNCH-P (Puromycin-associated Nascent Chain Proteomics)** передбачає інтеграцію біотинільованого пуроміцину в нові білки, які потім виділяють і аналізують за допомогою рідинної хроматографії-мас спектрометрії (LC-MS/MS) [12]. Цей підхід дозволяє ідентифікувати новосинтезовані білки і дає уявлення про специфічні для клітинного циклу коливання синтезу білків.

### 1.3.1 Методи SCENITH та SUNSET

У цій роботі використано два методи, які базуються на включенні пуроміцину: SUnSET, нерадіоактивний метод моніторингу синтезу білка [10,11] та SCENITH [13].

SUnSET - це нерадіоактивний метод моніторингу синтезу білка. Він дозволяє кількісно оцінити глобальний синтез білка в окремих клітинах ссавців і гетерогенних клітинних популяціях. Цей метод використовує пуроміцин, антибіотик, який структурно імітує аміноацильні тРНК, вбудовуючись у поліпептидні ланцюги, що формуються, і зупиняючи трансляцію, запобігаючи елонгації. Вбудовування пуроміцину в новосинтезовані білки безпосередньо відображає швидкість трансляції мРНК *in vitro*. Виявлення пуроміцин-інкорпорованих білків досягається за

допомогою кон'югованих з флуорофором антипуроміцинових антитіл, які аналізуються за допомогою проточної цитометрії [10].

SCENITH базується на методі SUnSET, зосереджуючись на метаболічних дослідженнях. Він особливо корисний для аналізу рідкісних клітин у зразках цільної крові. SCENITH дозволяє відстежувати зміни в трансляції білків після обробки метаболічними інгібіторами, таким чином визначаючи метаболічні потенціали та залежності клітин і характеризуючи їх метаболічний стан.

### **Дизайн експерименту на основі методу SCENITH**

Детальний протокол наведено в розділі «Методи». В експерименті використовується пуроміцин, структурний аналог аміноацильних тРНК, який вбудовується в поліпептидні ланцюги, що формуються, і зупиняє трансляцію, запобігаючи елонгації. Пуроміцин додають до клітин, які попередньо інкубують зі специфічними метаболічними інгібіторами, щоб викликати зміни в їхніх метаболічних шляхах.

2-Дезокси-D-глюкоза (DG), аналог глюкози, інгібує гліколіз шляхом фосфорилування гексокіназою до 2-дезоксид-глюкозо-6-фосфату, який не може далі метаболізуватися в гліколітичному шляху, ефективно блокуючи цей шлях. Таким чином, клітини адаптуються, збільшуючи окислення жирних кислот та амінокислот для забезпечення своїх енергетичних потреб [14].

Олігоміцин (O) інгібує АТФ-синтазний комплекс у внутрішній мембрані мітохондрій, порушуючи окисне фосфорилування (OXPHOS), і клітини використовують переважно аеробний гліколіз.

Комбінація DG та олігоміцину дозволяє комплексно оцінити метаболічний профіль. Це досягається шляхом розрахунку метаболічних залежностей за формулою, яка включає в себе середні значення інтенсивності флуоресценції для пуроміцину в умовах кожного з метаболічних інгібіторів (Рисунок 1.3.1.2 – Схематичне зображення розрахунку метаболічних залежностей). Цей підхід дозволяє визначити гліколітичну здатність і



додавання інгібіторів); DG = 2-деокси-Д-глюкоза; O = Олігоміцин; DGO = суміш інгібіторів DG та O.

## РОЗДІЛ 2

### МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

#### 2.1. Матеріали

##### 2.1.1. Клітини

- Мононуклеарні клітини периферичної крові людини (МКПК)
- НЕК-293 (ембріональні клітини нирки людини 293)
- Дермальні фібробласти людини (HDF)
- Т-лімфоцити, активовані з МКПК

##### 2.1.2. Склад поживних середовищ

Таблиця 2.1.2.1 – Склад поживних середовищ

| Поживне середовище                           | Виробник    | Номер каталогу |
|--|-------------|----------------|
| RPMI 1640 Medium,<br>GlutaMAX™<br>Supplement | Gibco™      | 61870044       |
| Human Plasma-Like<br>Medium (HPLM)           | Gibco™      | A4899102       |
| Dulbecco's Modified<br>Eagle Medium(DMEM)    | Gibco™      | 10566016       |
| Cryopreservation<br>Medium                   | PAN-Biotech | P30-3306       |
| Penicillin-Streptomycin                      | PAN-Biotech | P06-07100      |

##### 2.1.3. Реагенти та розчинники

Таблиця 2.1.3.1 – Реагенти та розчинники

| Назва   | Виробник               | Номер каталогу |
|---|------------------------|----------------|
| DPBS (no Ca, Mg)  | Gibco                  | 14190169       |
| Cycloheximide   | Sigma-Aldrich          | C1988          |
| 2-Deoxy-D-glucose   | thermofisher           | 111980250      |
| Oligomycin A  | Sigma-Aldrich          | 75351-5MG      |
| Brefeldin A Solution  | Biolegend              | 420601         |
| Puromycin Dihydrochloride                                     | Gibco                  | A1113803       |
| Bovine Serum Albumin (BSA), 10%                               | Sigma-Aldrich          | 126615         |
| True-Stain Monocyte Blocker™                                  | Biolegend              | 426103         |
| Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution)           | Biolegend              | 422302         |
| eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set | ThermoFisherScientific | 00-5523-00     |
| Trypsin-EDTA (0,25%)  | Gibco™                 | 25200056       |

#### 2.1.4. Антибіотики

Таблиця 2.1.4.1 – Використані антибіотики

| Назва  | Виробник  | Номер каталогу |
|--|-----------|----------------|
| AF488 hu CD3                                   | Biolegend | 317310         |
| BV785 hu CD4                                   | Biolegend | 344642         |
| Brilliant Violet 711™ anti-human CD8a Antibody | Biolegend | 301043         |

|   |                        |               |
|---|------------------------|---------------|
| BD Horizon™ BUV395 Mouse Anti-Human CD45RA                              | BD biosciences         | 569489        |
| PE anti human CD62L   | Biolegend              | 304805        |
| Anti-Puromycin, clone 12D10, Alexa Fluor® 647 Conjugate Antibody, 100µl | Sigma-Aldrich          | MABE343-AF647 |
| CD 14 - Al488 (FITC)  | Biolegend              | 367129        |
| PE anti-human CD3 Antibody  | Biolegend              | 317308        |
| Brilliant Violet 510™ anti-human CD8a Antibody                          | Biolegend              | 300934        |
| Brilliant Violet 605™ anti-human CD197 (CCR7) Antibody                  | Biolegend              | 353224        |
| PE/Cyanine7 anti-human CD56 (NCAM) Antibody                             | Biolegend              | 362509        |
| eBioscience fix viability dye eFluor780                                 | ThermoFisherScientific | 65-0865-18    |
| Alexa Fluor® 488 anti-human CD14 Antibody                               | Biolegend              | 367129        |
| BD Horizon™ BUV395 Mouse Anti-Human CD45RA                              | BD biosciences         | 569489        |
| Brilliant Violet 785™ anti-human CD4 Antibody                           | Biolegend              | 344641        |
| PE anti-human CD3 Antibody  | Biolegend              | 317308        |
| Brilliant Violet 510™ anti-human CD8a Antibody                          | Biolegend              | 300934        |
| Brilliant Violet 605™ anti-human CD197 (CCR7) Antibody                  | Biolegend              | 353224        |
| PE/Cyanine7 anti-human CD56 (NCAM) Antibody                             | Biolegend              | 362509        |

## **2.2. Методи**

### **2.2.1. Клітини та підтримання клітинних ліній**

Утримання клітинної культури проводили під ламінарним витяжним боксом. Клітини інкубували при 37C та 5% CO<sub>2</sub>

#### **НЕК-293**

НЕК-293 (ембріональні клітини нирки людини 293) -- це клітинна лінія з епітеліальною морфологією, яка була виділена з нирки абортваного людського ембріона. Клітини підтримувалися в поживному середовищі Dulbecco's Modified Eagle Medium (з високим вмістом глюкози), з додаванням 15% ембріональної сироватки великої рогатої худоби і 1% пеніцилін-стрептоміцину, і культивувалися в інкубаторі при 37 C і 5% CO<sub>2</sub>. Середовище змінювали кожні 3 дні для підтримання росту та нормального поділу та розділялися між флаконами для культур клітин, коли клітини досягали щільності заповнення у 90%. Клітини трипсинізували 0,25% трипсином-ЕДТА.

**Дермальні фібробласти людини (HDF).** HDF були контрольними клітинними лініями, отриманими від здорових донорів у співпраці з доктором Маркусом Шульке (Dr. Markus Shuelke). Для проведення експерименту клітини підтримували в 2 різних середовищах, таких як Human Plasma-Like Medium (HPLM) та Dulbecco's Modified Eagle Medium (з високим вмістом глюкози) (DMEM), обидва з додаванням 15% ембріональної сироватки великої рогатої худоби і 1% пеніцилін-стрептоміцину, і культивували в інкубаторі при температурі 37°C і 5% CO<sub>2</sub>. Поживне середовище змінювали кожні 3-4 дні для підтримання росту клітин і розділяли при досягання щільності заповнення у 90%. Клітини трипсинізували 0,25% трипсином-ЕДТА.

### 2.2.2. Активація Т клітин та SCENITH

Всі Т-лімфоцити були культивовані у Human Plasma-Like Medium (HPLM) з додаванням 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби, 10 нг/мл людського інтерлейкіну-2 (hIL-2) та 1% пеніцилін-стрептоміцину та зберіали в інкубаторі при температурі 37°C і 5% CO<sub>2</sub>.

Т-лімфоцити активували з ПКМК за допомогою Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 у співвідношенні гранул до клітин 1:1 (для отримання додаткової інформації використовуйте протокол, наданий Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28, Gibco). Активацію Т-лімфоцитів проводили за 3 дні та за 1 день до проведення аналізу SCENITH для оцінки як трансляційної активності, так і метаболічної активності в різні проміжки часу. Для порівняння використовували контроль клітин, який не піддавався активації.

Перед проведенням експерименту SCENITH на активованих Т-клітинах, Т-клітини протестували на маркери активації CD25 і CD69 за допомогою проточної цитометрії, щоб підтвердити успішну активацію на 3-й день.

Панель, що використовується для проточного цитометра, вказана в розділі «Проточна цитометрія» (Дизайн панелі - Панель для активації Т-клітин).

### 2.2.3. протокол SCENITH

Кріопробірку з Мононуклеарними клітинами периферичної крові людини (МКПК) розморожували на водяній бані при 37°C, висівали у необхідній концентрації (2,0 - 5,0 x 10<sup>6</sup> клітин/мл, 100 мкл у 96-лунковий планшет (або 1 x 10<sup>6</sup>, 1 мл у пробірку об'ємом 1,5 мл). Клітини обробляли протягом 15-30 хвилин для отримання негативного контролю (без додавання пуроміцину), позитивного контролю, 2-дезоксид-Д-глюкози (DG, кінцева концентрація 100 мМ), олігоміцину (Oligo, кінцева концентрація 1 мкМ) і суміші олігоміцину і 2-дезоксид-Д-глюкози в тій же концентрації. Як додатковий негативний контроль Циклогексимід (chx, кінцева концентрація 25 нг/мл) додавали на 15

хвилин. Пуроміцин (пуго, кінцева концентрація 10 мкг/мл) і Брефельдин А (BFA, кінцева концентрація 10 мкг/мл) додавали після обробки інгібіторами до всіх зразків, крім негативного контролю, на 15-30 хвилин. Інкубацію проводили при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Після обробки пуго, клітини промивали в PBS/0,1%BSA. Клітини фарбували флуоресцентним барвником, який допомагає розрізнити живі та мертві клітини протягом 10 хвилин, промивали в PBS/0,1%BSA, а потім інкубували в розчині для блокування моноцитів і FcX (1:100) протягом 15 хвилин на льоду. Потім додавали первинні кон'юговані антитіла проти поверхневих маркерів протягом 30 хвилин при 4°C в PBS/BSA. Після промивання, клітини фіксували та пермеабілізували робочим розчином для фіксації та пермеабілізації FOXP3 (Thermofisher eBioscience) протягом 30 хвилин при 4°C. Клітини промивали в буфері для пермеабілізації, після 15 хвилин блокування моноцитами і блокуючим розчином FcX (1:100), а потім, без промивання, фарбували моноклональними антитілами проти пуроміцину (фінальна концентрація 1:200) в буфері для пермеабілізації протягом додаткових 30 хвилин. Клітини промивали та додали 150-300 мл PBS та тримали при 4°C для подальшого аналізу на проточному цитометрі.

#### **2.2.4. Проточна цитометрія**

Проточна цитометрія - це метод, який аналізує та кількісно оцінює фізичні та хімічні характеристики окремих клітин або частинок, коли вони проходять через лазерний промінь. Ця взаємодія змушує клітини розсіювати світло в різних напрямках: пряме розсіювання корелює з розміром клітини, а бічне розсіювання надає інформацію про складність або гранулярність клітини.

#### **Проточна цитометрія Компенсація.**

**Компенсація сигналів в проточній цитометрії** - це важливий процес корекції перекриття сигналів флуоресценції від різних флуорохромів у

багатокольоровій проточній цитофлуориметрії. Цей метод передбачає математичне коригування даних флуоресценції, щоб гарантувати, що кожен канал відображав тільки сигнал відповідного флуорофора, віднімаючи перекриття від інших каналів. Ця корекція є важливою для точного аналізу, оскільки спектральне перекриття може призвести до хибнопозитивних результатів, коли клітина експресує кілька маркерів, хоча насправді не експресує.

Для встановлення компенсації використовували комбінацію повністю забарвлених зразків (full-stained), незабарвлених зразків (unstained) і забарвлених тільки в один барвник для контролю. Крім того, для забезпечення стабільного і високого співвідношення сигнал/шум використовували компенсаційні гранули на протигагу живим клітинним зразками, які в свою чергу краще відображають реальні біологічні умови і автофлуоресценцію.

### Дизайн панелі

Дизайн панелей для проточної цитофлуориметрії був стратегічно адаптований відповідно до експериментальних потреб. Спочатку було обрано різноманітний набір маркерів для характеристики різних імунних популяцій та їх функцій в МКПК. У міру того, як фокус змістився в бік детального аналізу субпопуляцій Т-лімфоцитів, панель була вдосконалена, щоб націлити її на маркери, що вказують на функціональність і диференціювання Т-лімфоцитів. Для простіших експериментів з однорідними популяціями, такими як НЕК-293 та фібробласти, панель була спрощена, щоб включити лише основні маркери для оцінки життєздатності клітин та синтезу білка (анти-пуроміцин антитіло).

Таблиця 2.2.4.1 –Дизайн панелі

|                 |                               |                                    |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Панель для МКПК | Панель для активації Т клітин | Панель для НЕК-293 та фібробластів |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------------|

|                             |                             |                          |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| e780- APC-cy7-<br>live dead | e780- APC-cy7-<br>live dead | e780- APC-cy7- live dead |
| Anti-puromycin-<br>AF674    | Anti-puromycin-<br>AF674    | Anti-puromycin-AF674     |
| CD14 - A1488<br>(FITC)      | CD3 – AF488                 | –                        |
| CD45RA -<br>BUV395          | CD4 – BV785                 | –                        |
| CD4 - BV785                 | CD8 – BV711                 | –                        |
| CD3 - PE                    | CD69 – PE-<br>Vio770        | –                        |
| CD8 - BV510                 | CD25 – BV510                | –                        |
| CCR7 - BV605                | –                           | –                        |
| CD56 - PE-cy7               | –                           | –                        |

Кожна панель була ретельно розроблена, щоб мінімізувати спектральне перекриття, спростити процес компенсації та підвищити точність аналізу даних.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ

#### **3.1. Тестування опублікованого методу SCENITH на Мононуклеарних Клітинах Периферичної Крові**

Основною метою цього розділу була перевірка специфічності сигналу та затвердження стандартного протоколу SCENITH на мононуклеарних клітинах периферичної крові (МКПК). Аналіз SCENITH був проведений для демонстрації різних аспектів надійності аналізу.

Спочатку виявлення сигналу пуроміцину було підтверджено за допомогою простої експериментальної установки з використанням циклогексиміду (chx), відомого інгібітора білкової трансляції. Результати, як показано на Рисунку 3.1.a, демонструють значне зниження сигналу пуроміцину під впливом циклогексиміду порівняно з позитивним контролем (тільки пуроміцин), що підтверджує специфічність сигналу пуроміцину. Варто зазначити, що моноцити демонстрували більш ніж удвічі вищу трансляційну здатність порівняно з іншими типами клітин, що може бути пов'язано з їхнім більшим розміром (Рисунок 3.1.b).

Для подальшої валідації аналізу, експерименти з метаболічними інгібіторами, зокрема 2-DG (інгібітор гліколізу) та олігоміцином (інгібітор комплексу V), підтвердили сигнал пуроміцину за умов метаболічного пригнічення. Як показано на Рисунку 3.1.c, клітини, оброблені комбінацією 2-DG та олігоміцину (DGO), демонстрували нижчий сигнал пуроміцину порівняно з клітинами, обробленими лише одним інгібітором або порівняно до позитивного контролю. Це свідчить про те, що клітини мають обмежені метаболічні шляхи для виробництва АТФ, необхідного для синтезу білка, коли гліколіз та окисне фосфорилування (OXPHOS) пригнічені одночасно.

Для забезпечення відтворюваності аналізу були проведені технічні дублікати ( $n=2$ ), які продемонстрували узгоджений та майже однаковий сигнал пуроміцину ( рисунок 3.1.d, e).

Аналіз SCENITH також проводили на МКПК ,отриманих від трьох різних донорів, одночасно, щоб оцінити варіабельність метаболічних потреб і трансляційної здатності серед різних осіб. Результати, показані на рисунку 3.1,g, вказують на те, що наївні Т-клітини CD4 і CD8 всіх донорів мали нижчу інтенсивність трансляції під час обробки Олігоміцином, тоді як Т-клітини пам'яті CD4 і CD8 демонстрували вищу здатність до трансляції. Це свідчить про те, що наївні Т-лімфоцити більше покладаються на OXPHOS для підтримки свого довготривалого виживання і стану спокою, тоді як Т-лімфоцити пам'яті краще адаптуються до метаболічних зрушень.

Розрахунки метаболічної залежності (рисунок 3.1.g) також підтвердили, що наївні Т-клітини CD4 і CD8 більше залежать від OXPHOS порівняно з Т-клітинами пам'яті. Цей висновок узгоджується з існуючими літературними даними, які вказують на те, що периферичні наївні Т-лімфоцити переважно використовують цикл трикарбонних кислот і OXPHOS для генерації АТФ [51].

Цікаво, що один із донорів (1107\_08) продемонстрував вищу здатність до трансляції в CD8 Т-клітинах пам'яті під впливом олігоміцину порівняно з іншими донорами, що свідчить про потенційну імунну відповідь або активаційний статус, унікальний для цього донора.

В цілому, отримані дані підтверджують можливість використання методу SCENITH в умовах інгібування трансляції (chx) та блокади метаболічних шляхів (2-ДГ та олігоміцин). Аналіз SCENITH ефективно визначає метаболічні профілі та рівні синтезу білків у різних клітинних популяціях, а основні висновки узгоджуються з раніше опублікованими даними щодо метаболічних переваг Т-клітин [37, 38, 39].

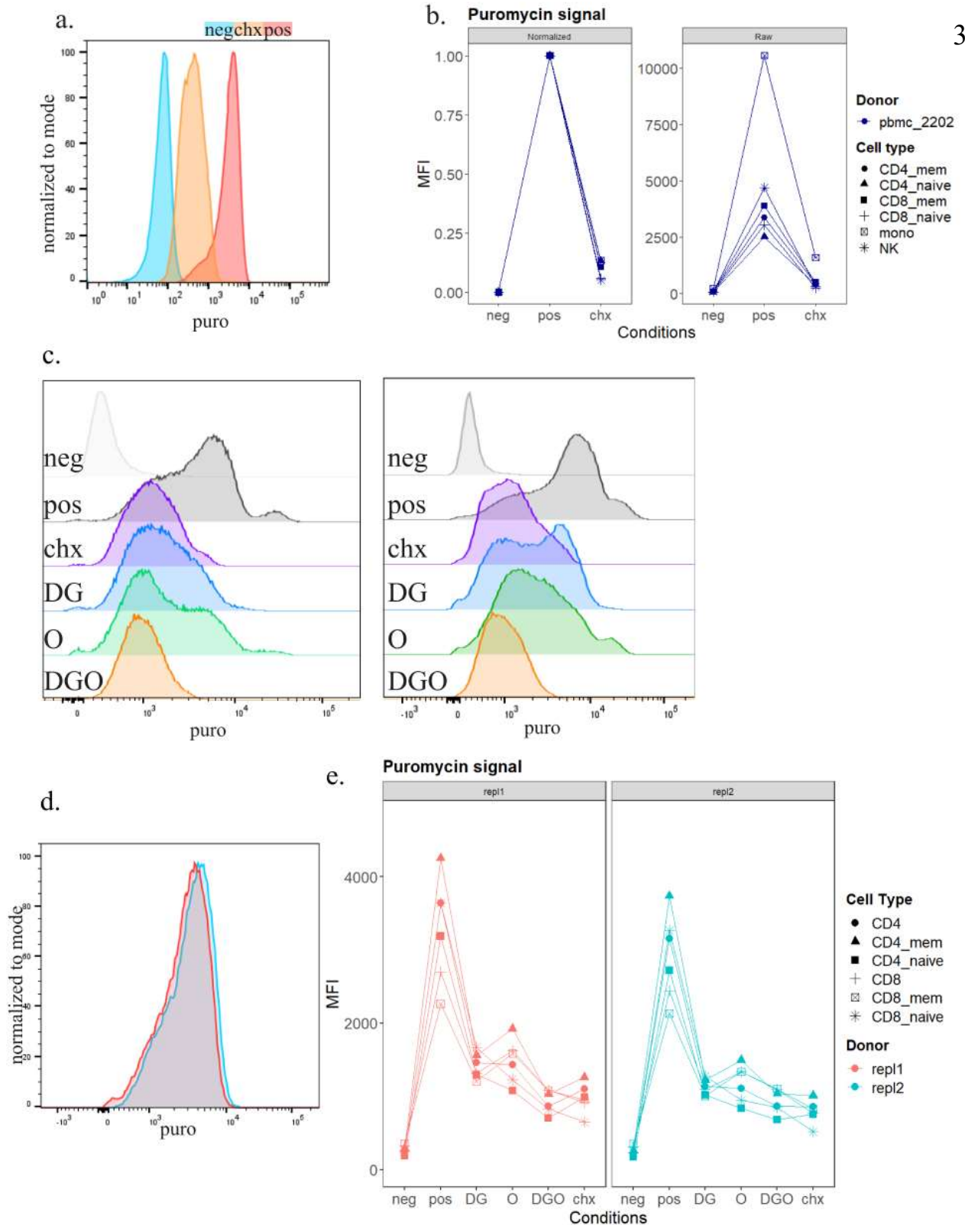
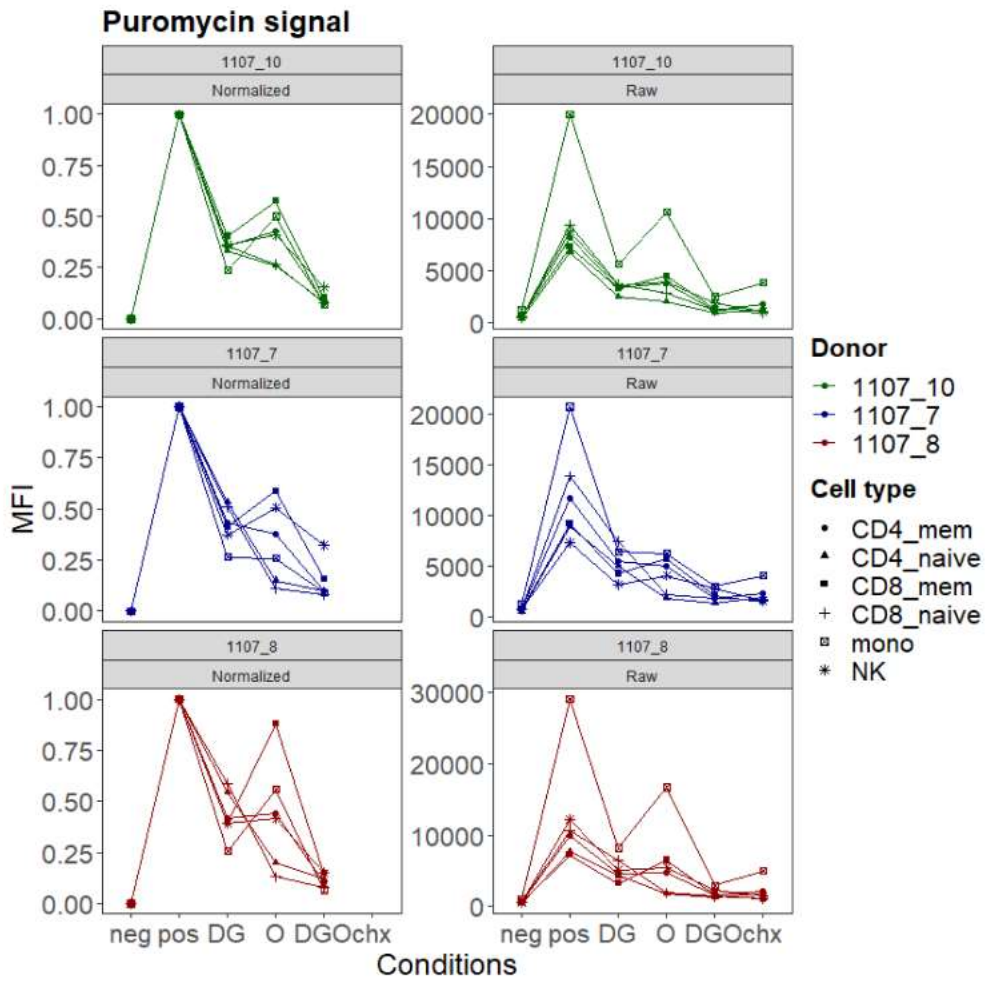
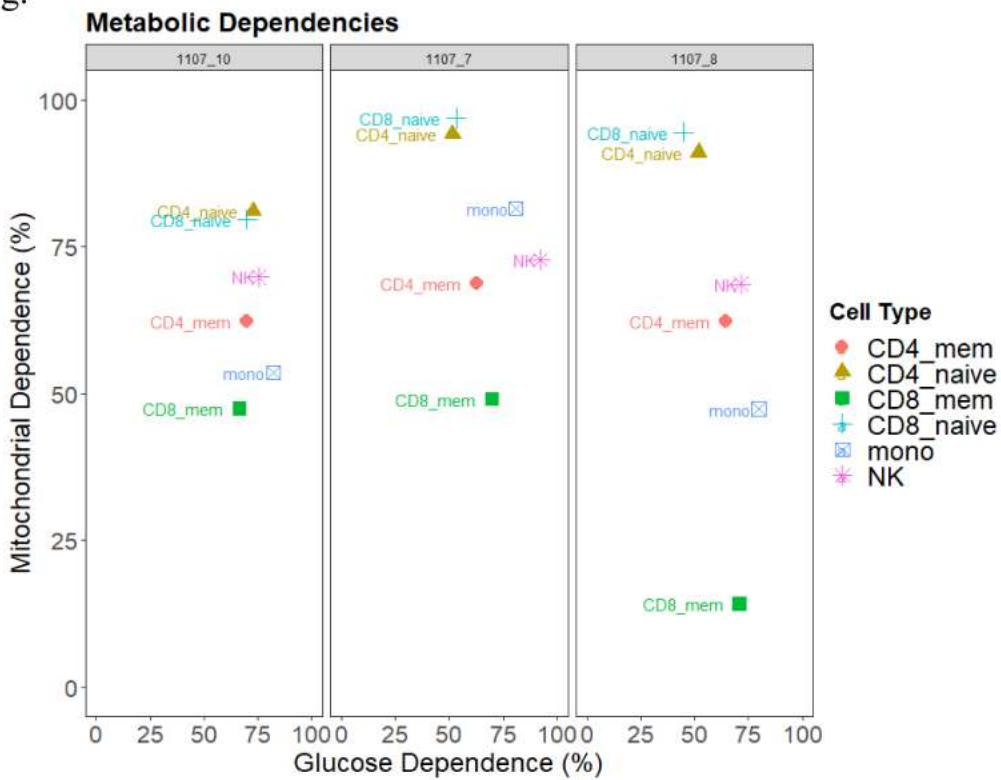


Рисунок 3.1 - Валідація методу SCENITH. Умови: neg = негативний (без додавання пуроміцину), pos = позитивний, DG = 2-дезоксид-Д-глюкоза (інгібітор гліколізу), O = олігоміцин (інгібітор OXPHOS), chx = циклогексимід (інгібітор синтезу білка). **a**, -- сигнал пуроміцину за умов neg, pos, chx; **b**, -- точковий графік значень mfi (ненормалізованого та нормалізованого) для експерименту, показано на **a**; **c**, -- два незалежних експерименти SCENITH. Гістограма сигналу пуроміцину; **d**, -- технічні дублікати; **e**, -- точковий графік пуromo-mfi (ненормалізовані та нормалізовані) значення експерименту з технічними дублікатами; Негативні значення mfi були вилучені зі значень mfi (==corrected\_mfi), а скориговані значення mfi нормалізовані шляхом ділення на скориговані позитивні mfi.

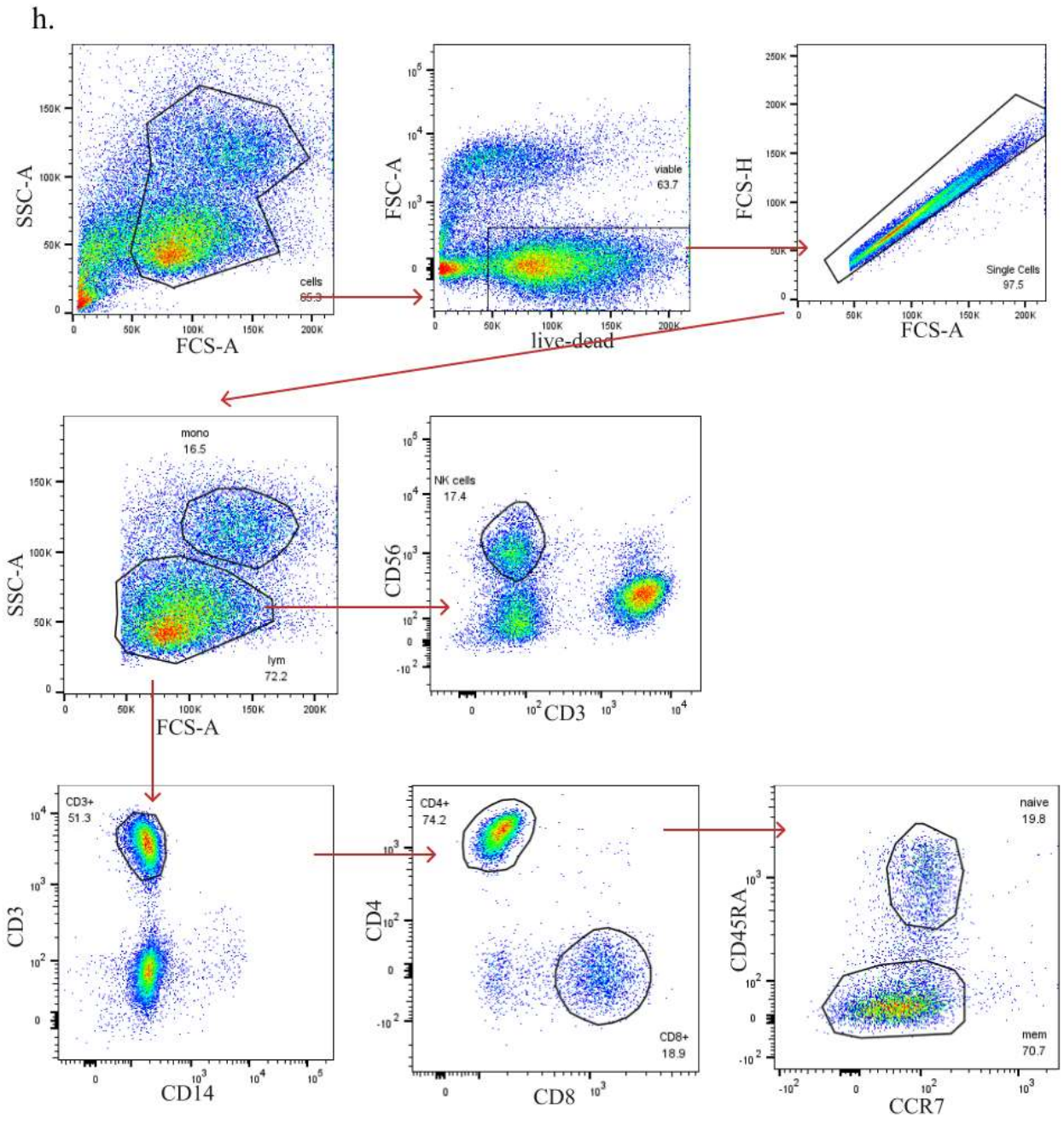
f.



g.



Продовження рисунку 3.1-- f, -- точковий графік значень purom-mfi 3 різних донорів; g, -- метаболічний профіль донорів, зображених на f.



Продовження рисунку 3.1-- h, -- стратегія гейтингу. mono = моноцити, lym = лімфоцити, mem = Т клітини пам'яті.

### 3.2. Метод SCENITH на НЕК-293 (ембріональні клітини нирки людини 293)

У цьому розділі роботи, метод SCENITH застосовується на ембріональних клітинах нирки людини – НЕК-293.

Основна мета цієї роботи - продемонструвати, що SCENITH може бути ефективно застосований до різноманітних типів тканин та клітин, включаючи суспензії та адгезійні клітинні лінії.

Аналіз SCENITH проводили на трипсинізованих (в суспензійному вигляді) клітинах і адгезійних клітинах НЕК та були проведені 3 різні експерименти. Стратегія гейтингу для відбору певних популяцій (“gating strategy”) зображена на рисунку 3.2.a.

Аналіз підтвердив відтворюваність і постійність сигналу пуроміцину при різних умовах в експерименті з дублікатами (дублювання експерименту на однакових зразках, в один той самий час), як показано на рисунку 3.2.b.

Слід зазначити, що інтенсивність трансляції під час обробки Олігоміцином була приблизно такою ж, як і в позитивному контролі (без додання інгібіторів), що свідчить про мінімальну залежність від OXPPOS і основну залежність від гліколізу для виробництва енергії (Рисунок 3.2.b,f). Ця метаболічна залежність від гліколізу більш детально показана на рисунку 3.2.h.

Під час інкубації з інгібіторами на клітинах НЕК-293 в адгезійному стані, спостерігали посилене відшарування клітин в умовах DGO під час їх інкубації, що вказує на вплив DGO на адгезію клітин. Було відмічено варіабельність розміру клітин та нижчий рівень життєздатності приблизно 53% в умовах DGO, порівняно з 83-92% в інших умовах (рисунок 3.2.c,d,e). Несподівано, вищий сигнал пуроміцину при обробці DG порівняно з позитивним контролем свідчить про компенсаторну метаболічну реакцію, що, можливо, вказує на перехід до альтернативних джерел енергії (рисунок 3.2.g) .

Через підвищену розшарованість та відставання клітин від поверхні культивуваційної посудини під час інкубація DGO в адгезійному стані і варіабельність в розмірах клітин, подальші аналізи проводили виключно на клітинах в суспензійному вигляді. Цікаво, що сигнал пуроміцину під впливом DG був нижчим, ніж під впливом DGO (рисунок 3.2.g).

Загалом, клітини НЕК показали мінімальну залежність від OXPPOS, так як сигнал під впливом Олігоміцину в більшості випадків був подібним до позитивного контролю. Нижча здатність до трансляції під впливом DG також свідчить про значну залежність від гліколізу. Значний вплив інгібування гліколізу самим лише DG вказує на те, що додаткове інгібування Олігоміцином при обробці DGO не призводить до значного зниження сигналу, підкреслюючи залежність переважно від гліколізу.

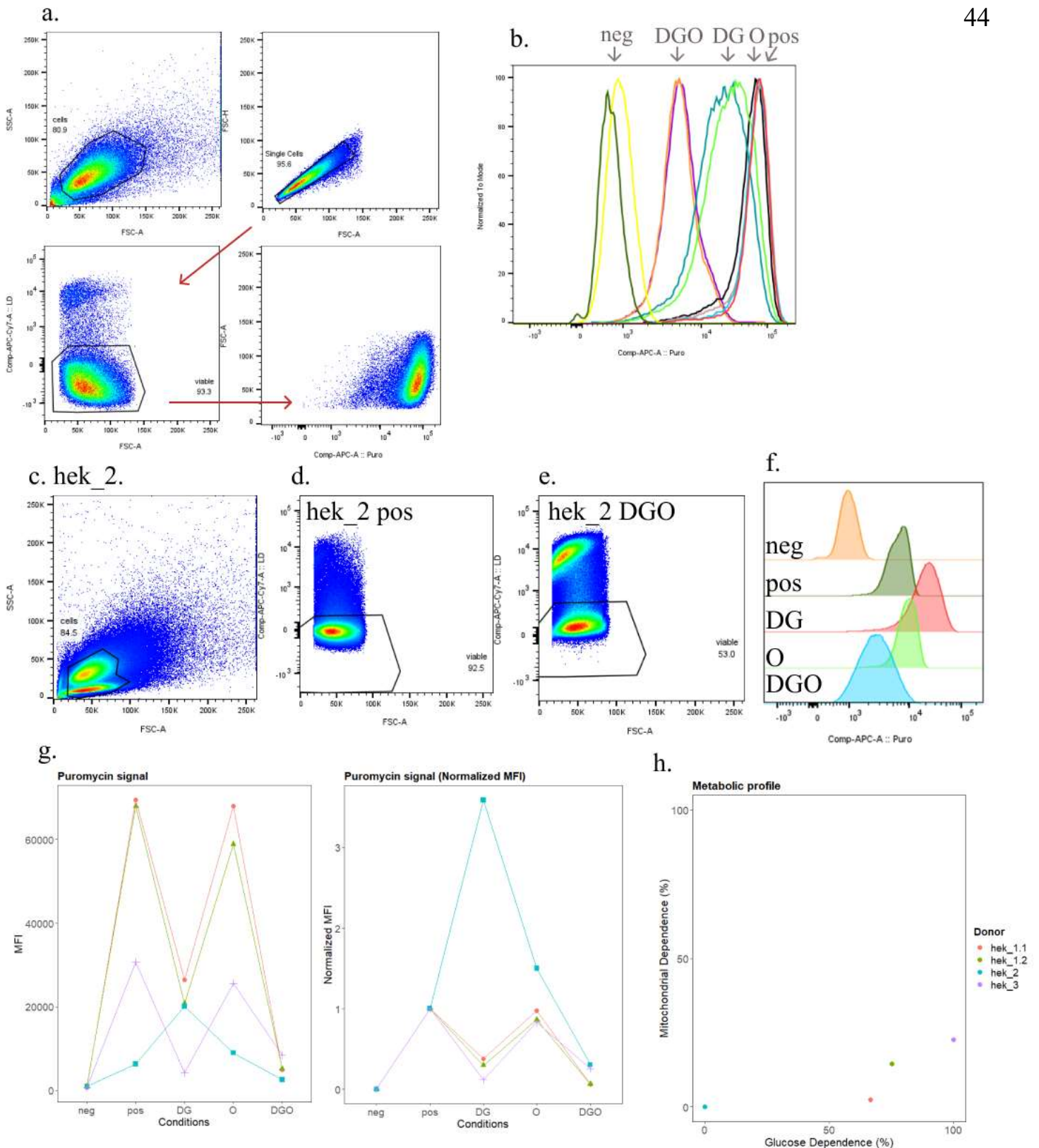


Рисунок 3.2 - SCENITH на клітинах HEK-293. Умови: neg = негативний (без додавання пуроміцину), pos = позитивний, DG = 2-дезоксид-глюкоза, O = олігоміцин, DGO = 2-дезоксид-глюкоза та олігоміцин. **a**, стратегія гейтингу. **b**, сигнал пуроміцину в досліді з дублікатами. **c**, SSC і FSC показують дві різні популяції. **d**, рівень життєздатності під позитивним контролем у конкретному експерименті. **e**, рівень життєздатності під позитивним контролем у конкретному експерименті. **f**, гістограми сигналу пуроміцину, що демонструють вищу здатність до трансляції під впливом DG. **g**, ліворуч - точковий графік, що показує сигнал пуроміцину в усіх експериментах, праворуч - нормалізовані значення mfi. Негативні значення mfi були відняті від значень mfi ( $=corrected\_mfi$ ), а виправлені значення mfi нормалізовані шляхом ділення на виправлені позитивні значення mfi. **h**, метаболічний профіль, розрахований на основі нормалізованих значень mfi, показує, що HEK в основному покладаються на гліколіз, з неочікуваної подією в hek\_2.

### 3.3. Метод SCENITH на фібробластах

Дермальні фібробласти людини (англ: «HDF») - це спеціалізовані клітини, отримані з шару дерми шкіри людини, які відіграють ключову роль у синтезі компонентів позаклітинного матриксу, що підтримують цілісність шкіри та сприяють процесам загоєння ран. У цьому дослідженні для вивчення базової метаболічної активності використовували контрольні фібробласти здорових донорів без генетичних мутацій. Основна мета полягала в аналізі метаболічних реакцій цих контрольних фібробластів в генетично незміненому контексті (без відомих мутацій, які призводять до хвороб), а також для спостереження за адаптацією до різних умов поживного середовища.

Аналіз SCENITH спочатку був застосований до контрольного зразка одного донора, та показало можливість використання на цих типах клітин. Фібробласти культивували в повному середовищі DMEM (детально в методах). Обробку інгібітором і пуроміцином проводили на адгезованих клітинах, щоб відобразити інтенсивність трансляції і метаболічні залежності в їх більш природному стані. Час інкубації в обох випадках було скорочено до 15 хвилин, що відрізняється від початкового протоколу (детально в методах).

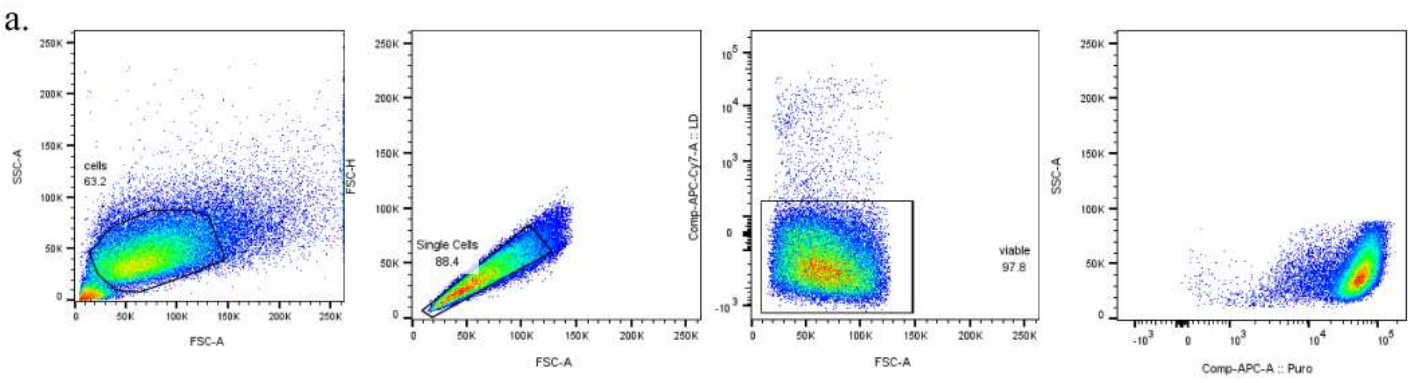
Наступний експеримент проводили на фібробластах, які культивували в повному середовищі HPLM і DMEM, щоб оцінити метаболічну адаптацію до цих середовищ, очікуючи побачити відмінності в метаболічних реакціях між цими двома середовищами. На відміну від попередніх експериментів, перед обробкою пуроміцином та інгібітором клітини трипсинізували 0,25% розчином трипсину-ЕДТА.

Результати детально показано на рисунку 3.3. Стратегія гейтингу зображена на рисунку 3.3.а, починаючи з бічного розсіювання (SSC-A) проти прямого розсіювання (FSC-A) для оцінки розміру клітин і гранулярності основної популяції, з подальшим виключенням дублетів, які відображають сигнал двох або більше клітин як одну подію. Життєздатні клітини відбирали

шляхом побудови графіків FSC-A і APC-Cy7, що відповідають забарвленню барвнику для оцінки мертвих клітин, а потім життєздатну популяцію досліджували на наявність сигналу пуроміцину.

Донорські клітини K3, культивовані в повному середовищі DMEM, показали вищий сигнал пуроміцину під впливом Олігоміцину порівняно з позитивним контролем (Рисунок 3.3.e). Хоча ненормовані сигнали пуроміцину вказували на мінімальні відмінності між умовами, нормалізовані сигнали пуроміцину підкреслювали ці відмінності, що свідчить про те, що клітини піддаються компенсаторним механізмам у присутності Олігоміцину, що призводить до вищого синтезу білка. Донори K3 і K5 демонстрували подібні реакції на обробку інгібіторами в умовах HPLM, але K3 показав вищий рівень пуроміцину з точки зору середньої інтенсивності флуоресценції (MFI), що, можливо, вказує на вищу здатність до трансляції в цьому конкретному експерименті.

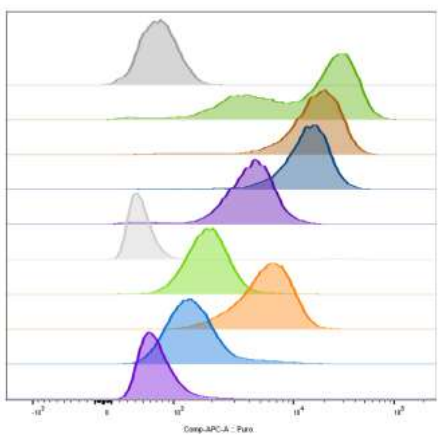
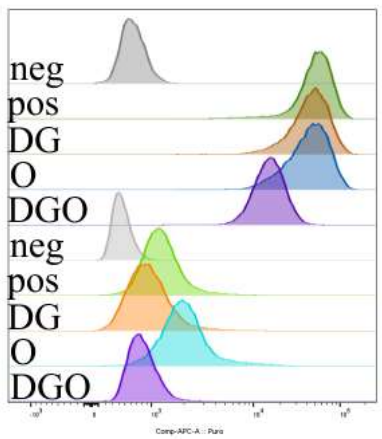
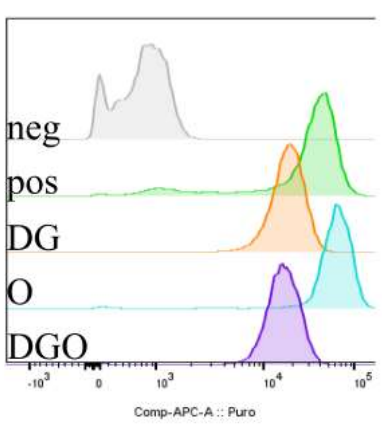
Загалом, дермальні фібробласти людини при дослідженні демонструють чіткі метаболічні адаптації за різних умов культивування. При використанні живильного середовища DMEM фібробласти показали компенсаторне збільшення трансляційної здатності під впливом олігоміцину. Це, ймовірно, пов'язано з переміщенням акценту на гліколіз як основне джерело виробництва АТФ при пригніченні функції мітохондрій. На протипагу цьому, фібробласти, культивовані в HPLM, демонстрували більш збалансовану метаболічну відповідь на інгібітори, з подібними рівнями відповіді на інгібітори. Це може свідчити про більш збалансоване використання як гліколізу, так і окисного фосфорилування для виробництва енергії. Ці результати встановлюють базовий рівень метаболічної активності в генетично незмінених HDF. Наступним кроком буде проведення аналізу на фібробластах з мітохондріальними мутаціями для подальшого розуміння їхніх метаболічних переваг і реакцій



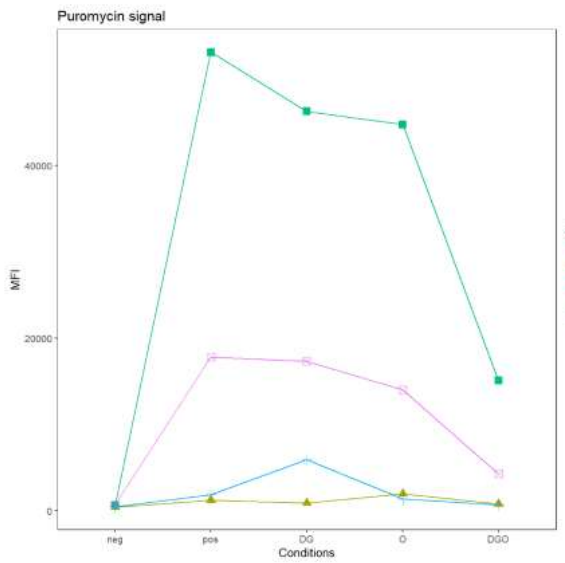
b. Донор K3

с. Донор K3

d. Донор K5



e.



f.

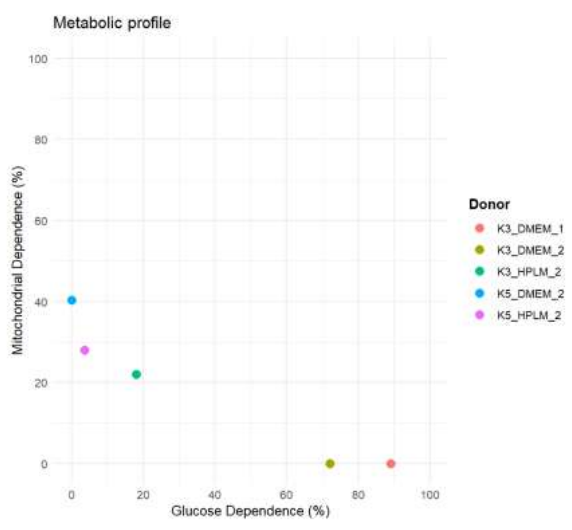


Рисунок 3.3 -- SCENITH на донорських здорових фібробластах .K2, K3, K5. DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium, HPLM = Human Plasma-like Medium. mfi = середня інтенсивність флуоресценції. Умови: neg = негативний (без додавання пуроміцину), pos = позитивний, DG = 2-дезоксид-D-глюкоза (інгібітор гліколізу), O = олігоміцин (інгібітор OXPBOS), DGO = 2-дезоксид-D-глюкоза та олігоміцин. a, стратегія гейтингу. b, сигнал пуроміцину mfi. c, d, сигнал пуроміцину mfi двох донорських фібробластів, культивованих у двох середовищах. e, mfi = медіана інтенсивності флуоресценції; точковий графік пуроміцинового сигналу з 2 різних експериментів та за різних умов, що вказує на трансляційну здатність. f, метаболічний профіль фібробластів. Негативні значення mfi були вилучені зі значень mdi (==corrected\_mfi), а скориговані значення mdi нормалізовані шляхом ділення на скориговані позитивні значення mfi.

### **3.4. Трансляційна здатність та метаболічний профіль Т клітин під час активації**

У цьому розділі метод SCENITH був застосований для дослідження здатності до трансляції та метаболічного профілю Т-лімфоцитів, які відіграють ключову роль в адаптивному імунітеті. Метою роботи є спостереження за змінами трансляційної здатності та метаболічного профілю Т-лімфоцитів на різних проміжках часу після активації.

Т-лімфоцити активували у співвідношенні активаційних гранул та клітин при 1:2 та 1:1 за допомогою Dynabeads (див. розділ «Методи») та оцінили за експресією маркерів активації CD25 та CD69 для підтвердження активації та визначення оптимального співвідношення гранул-до-клітин. На рисунку 3.4.a,b показано, що при співвідношенні гранул-до-клітин у 1:1 було більш ефективним, про що свідчить збільшення розміру клітин (на основі бічного розсіювання (SSC) і прямого розсіювання (FSC)) і вища експресія CD25 і CD69.

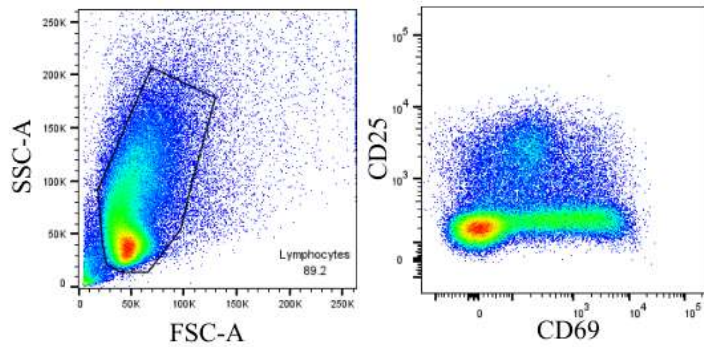
Використовуючи оптимізоване співвідношення гранул до клітин (1:1), аналіз SCENITH проводили через 0, 1 і 3 дні після активації. Зокрема, було спостережено збільшення розміру Т-клітин після активації, що є підтвердженням успішної активації (рисунок 3.4.c). Крім того, спостерігалось збільшення експресії маркерів активації, причому CD69 був більш помітно виражений на 1-й і 3-й дні, а CD25 демонстрував підвищену експресію на 3-й день, що вказує на його роль як маркера пізньої активації (рисунок 3.4.d). Більш важливо, що на 3-й день спостерігалось значне збільшення трансляційної здатності, особливо у CD4-позитивних Т-клітинах (рисунок 3.4.h). Це вказує на підвищену потребу в синтезі білка, оскільки клітини стають більш активованими.

Метаболічне профілювання виявило виражений зсув у бік гліколізу на 1-й і 3-й день (рисунок 3.4.i), що узгоджується з історичними спостереженнями

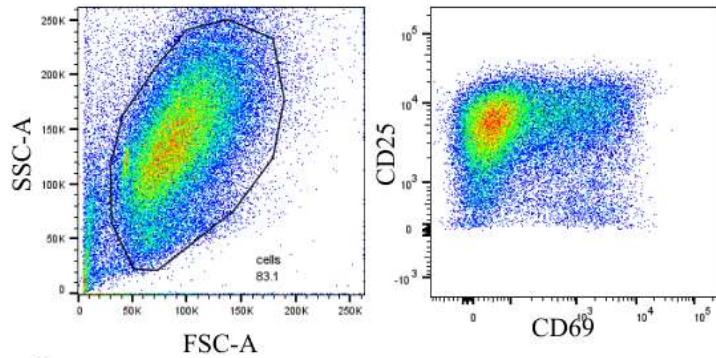
про перевагу гліколізу в активованих Т-клітинах. Цей зсув узгоджується з висновками Roos і Loos (1973), Warburg та ін. (1958) і недавніми дослідженнями з використанням технології Seahorse, проведеними Van der Windt та ін. (2013). Ці результати чітко зафіксували метаболічний перехід від базового стану до переважно гліколітичного профілю в активованих клітинах (рисунок 3.4).

Ці результати демонструють динамічні метаболічні адаптації, яких зазнають Т-лімфоцити під час активації, підкреслюючи їх функціональний стан, що постійно змінюється. Аналіз SCENITH ефективно фіксує ці зміни, що підкреслює його ефективність та цінність у використування для метаболічного профілювання активованих Т-лімфоцитів, що може бути важлими при дослідженні імунних відповідей в різних експериментальних установах.

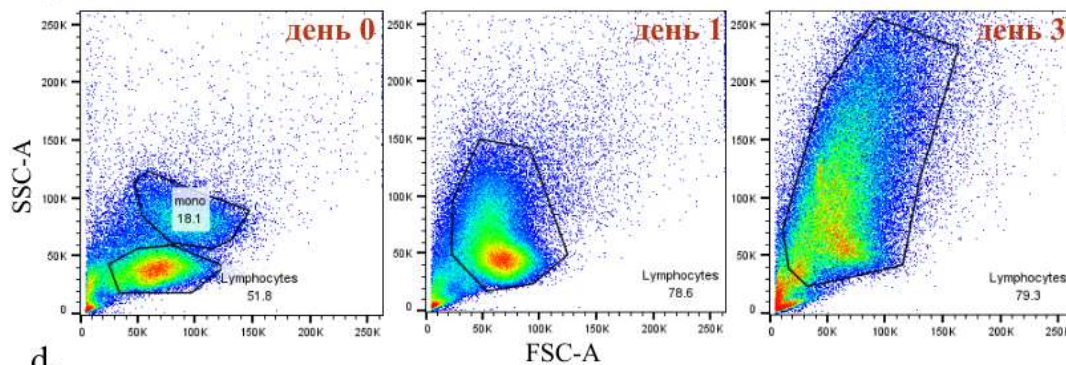
а. 1:2 (гранули:клітини)



б. 1:1(гранули:клітини)



с.



д.

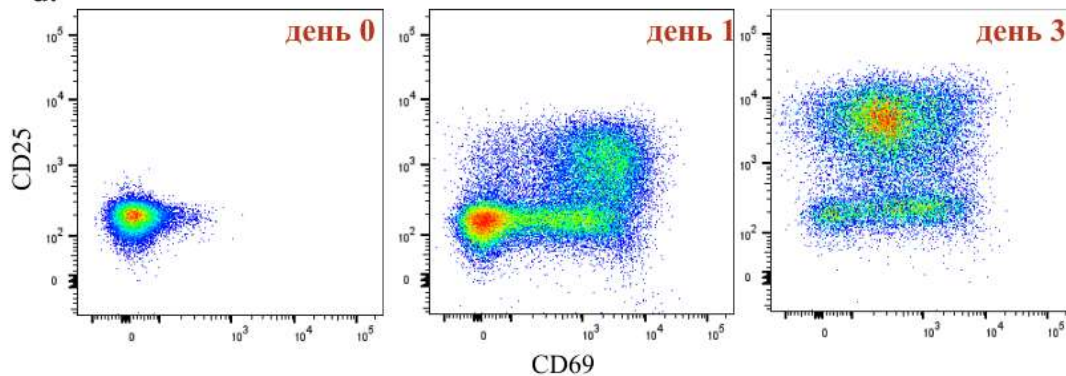
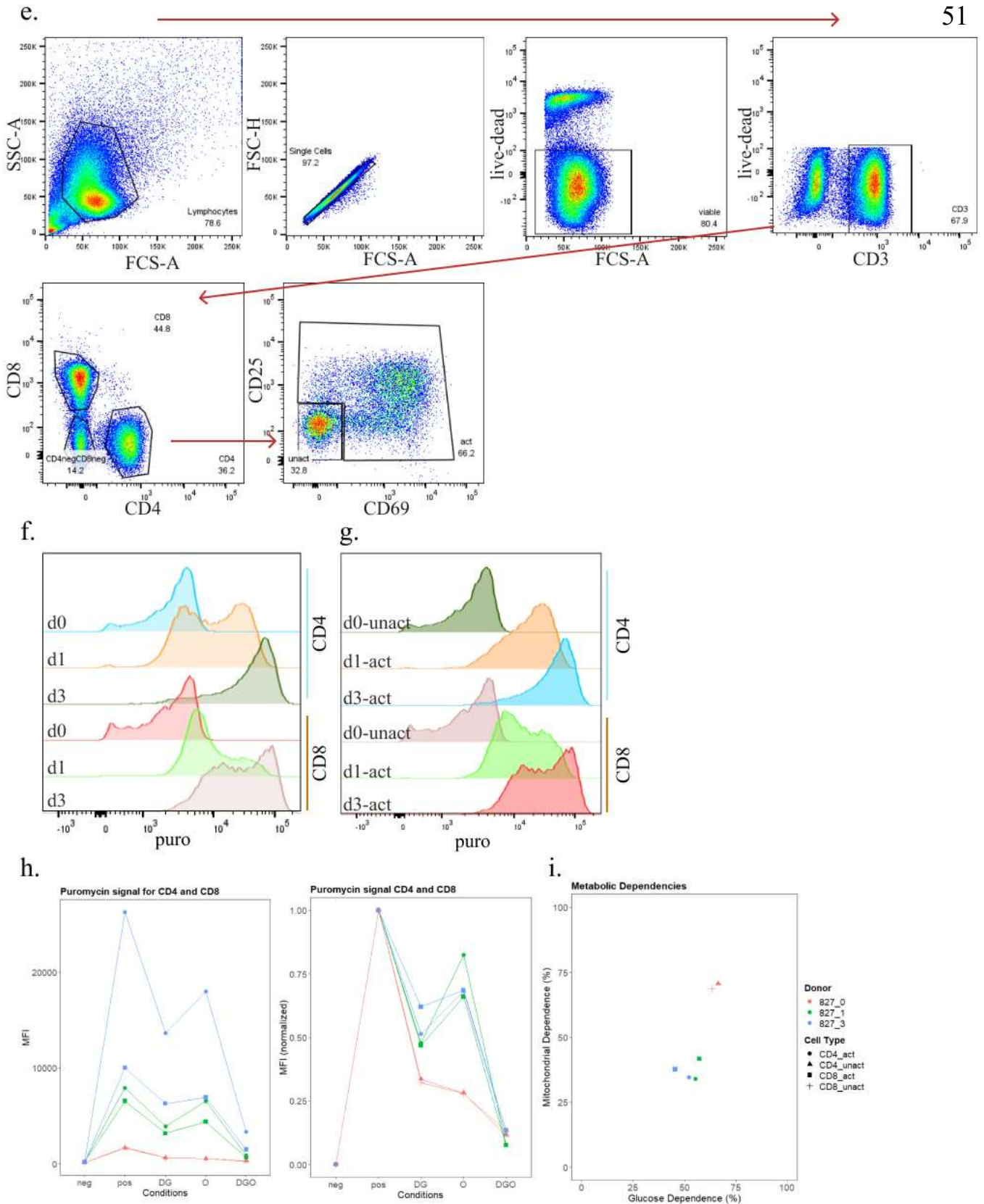


Рисунок 3.4 -- Трансляційна здатність та метаболічний профіль здорових Т-лімфоцитів під час активації. Умови: neg = негативний (без додавання пуроміцину), pos = позитивний, DG = 2-дезоксид-глюкоза (інгібітор гліколізу), O = олігоміцин (інгібітор OXPHOS), DGO = 2-дезоксид-глюкоза та олігоміцин. act = активовані; unact = неактивовані; d = день. **a, b** -- графіки проточної цитофлуориметрії, що показують розмір клітин та експресію CD25/CD69 у співвідношенні 1:2 та 1:1 активаційних гранул до клітини, відповідно, на 3-й день після активації; **c**, -- SSC та FSC демонструють збільшений розмір на 3-й день після активації; **d**, -- проточна цитофлуориметрія показує експресію CD25/CD69 після активації з вищою експресією маркера пізньої активації CD25 на 3-й день.



Продовження рисунку 3.4 -- **e.**, -- стратегія гейтингу, показує позитивний контроль на 1-й день після активації. Неактивована популяція, гейтована на основі основної неактивованої популяції 0-го дня (біологічний еталон); **f.**, -- сигнал пуроміцину в CD4 і CD8 після активації (гейтування всієї популяції); **g.**, -- сигнал пуроміцину порівнює неактивовану (0-й день) і активовану популяції CD4 і CD8; **h.**, -- точковий графік середньої інтенсивності флуоресценції (mfi) (ліворуч) і нормалізованої mfi (праворуч) сигналу пуроміцину; **i.**, -- метаболічний профіль.

### 3.5. Наступні кроки

Подальша робота буде зосереджена на порівнянні метаболічних профілів зразків пацієнтів з відомими мітохондріальними мутаціями та захворюваннями зі здоровими пацієнтами. Інтеграція аналізу SCENITH з передовими методами, такими як ASAP-seq, поглибить наше розуміння завдяки визначенню доступних рівнів хроматину, мітохондріальної ДНК, поверхневого та внутрішньоклітинного білка (пуроміцину) [42]. Такий башатофункціональний підхід розширить обсяг інформації, отриманої з експериментів, пропонуючи комплексний погляд на клітинний метаболізм і його регуляцію.

## ВИСНОВКИ

1. Метод SCENITH був успішно адаптований та валідований на різних типах клітин, продемонструвавши надійність і відтворюваність.
2. Аналіз SCENITH виявив узгоджені метаболічні патерни та специфічні біохімічні особливості, зокрема в наївних Т-лімфоцитах і Т-клітинах пам'яті. З використанням цього методу фіксується перехід до гліколізу при активації Т-клітин, демонструючи здатність SCENITH відстежувати метаболічні адаптації в них.
3. У клітинах лінії НЕК аналіз SCENITH підтвердив переважну залежність клітин від гліколізу для виробництва енергії з мінімальною залежністю від окислювального фосфорилування.
4. У клітинах фібробластів SCENITH висвітлив різноманітні метаболічні реакції за різних умов середовища, демонструючи адаптаційні можливості клітин. Зокрема, в умовах високого вмісту глюкози фібробласти збільшували свою трансляційну здатність при обробці олігоміцином, що, ймовірно, пов'язано з компенсаторним зсувом у бік гліколізу при пригніченні функції мітохондрій.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 561–563 (1970).
2. Esposito, A. M. & Kinzy, T. G. In vivo [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation. *Methods Enzymol.* 536, 55–64 (2014).
3. Schick, B. P. Synthesis of proteins from [<sup>35</sup>S]methionine by guinea pig megakaryocytes in vivo and time course of appearance of newly synthesized proteins in platelets. *Blood* 76, 887–891 (1990).
4. Dieterich, D. C. et al. In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 13, 897–905 (2010).
5. Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A. & Schuman, E. M. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9482–9487 (2006).
6. Dieterich, D. C. et al. Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nat. Protoc.* 2, 532–540 (2007).
7. Howden, A. J. et al. QuanNCAT: quantitating proteome dynamics in primary cells. *Nat. Methods* 10, 343–346 (2013).
8. Liu, J., Xu, Y., Stoleru, D. & Salic, A. Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 413–418 (2012).
9. Signer, R. A., Magee, J. A., Salic, A. & Morrison, S. J. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* 509, 49–54 (2014).
10. Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M. & Pierre, P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat. Methods* 6, 275–277 (2009).

11. Goodman, C. A. et al. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *FASEB J.* 25, 1028–1039 (2011).
12. Aviner, R., Geiger, T. & Elroy-Stein, O. Novel proteomic approach (PUNCH-P) reveals cell cycle-specific fluctuations in mRNA translation. *Genes Dev.* 27, 1834–1844 (2013).
13. Argüello RJ, Combes AJ, Char R, Gigan JP, Baaziz AI, Bousiquot E, Camosseto V, Samad B, Tsui J, Yan P, Boissonneau S, Figarella-Branger D, Gatti E, Tabouret E, Krummel MF, Pierre P. SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metab.* 2020 Dec 1;32(6):1063-1075.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2020.11.007. PMID: 33264598; PMCID: PMC8407169.
14. Singh R, Gupta V, Kumar A, Singh K. 2-Deoxy-D-Glucose: A Novel Pharmacological Agent for Killing Hypoxic Tumor Cells, Oxygen Dependence-Lowering in Covid-19, and Other Pharmacological Activities. *Adv Pharmacol Pharm Sci.* 2023 Mar 2;2023:9993386. doi: 10.1155/2023/9993386. PMID: 36911357; PMCID: PMC9998157.
15. Hirschev MD, Zhao Y. Metabolic Regulation by Lysine Malonylation, Succinylation, and Glutarylation. *Mol Cell Proteomics.* 2015 Sep;14(9):2308-15. doi: 10.1074/mcp.R114.046664. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25717114; PMCID: PMC4563717.
16. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:797-821. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.004053. PMID: 8352601.
17. Bian X, Jiang H, Meng Y, Li YP, Fang J, Lu Z. Regulation of gene expression by glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Trends Cell Biol.* 2022 Sep;32(9):786-799. doi: 10.1016/j.tcb.2022.02.003. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35300892.

18. James, D.E., Stöckli, J. & Birnbaum, M.J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 751–771 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00390-6>
19. Locasale JW, Cantley LC. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab.* 2011 Oct 5;14(4):443-51. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.014. PMID: 21982705; PMCID: PMC3196640.
20. Kochanowski K, Sander T, Link H, Chang J, Altschuler SJ, Wu LF. Systematic alteration of in vitro metabolic environments reveals empirical growth relationships in cancer cell phenotypes. *Cell Rep.* 2021 Jan 19;34(3):108647. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108647. PMID: 33472066; PMCID: PMC7877896.
21. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol.* 1927 Mar 7;8(6):519-30. doi: 10.1085/jgp.8.6.519. PMID: 19872213; PMCID: PMC2140820.
22. San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis.* 2017 Feb 1;38(2):119-133. doi: 10.1093/carcin/bgw127. PMID: 27993896; PMCID: PMC5862360.
23. Eniafe J, Jiang S. The functional roles of TCA cycle metabolites in cancer. *Oncogene.* 2021 May;40(19):3351-3363. doi: 10.1038/s41388-020-01639-8. Epub 2021 Apr 16. PMID: 33864000.
24. Ryan DG, Murphy MP, Frezza C, Prag HA, Chouchani ET, O'Neill LA, Mills EL. Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer. *Nat Metab.* 2019 Jan;1:16-33. doi: 10.1038/s42255-018-0014-7. PMID: 31032474; PMCID: PMC6485344.
25. Keller MA, Kampjut D, Harrison SA, Ralser M. Sulfate radicals enable a non-enzymatic Krebs cycle precursor. *Nat Ecol Evol.* 2017 Mar 13;1(4):83. doi: 10.1038/s41559-017-0083. PMID: 28584880; PMCID: PMC5455955.

26. Lieberman M, Peet A. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. Available online: <https://www.lww.co.uk/marks-basic-medical-biochemistry-content-content-content>
27. Ling, ZN., Jiang, YF., Ru, JN. *et al.* Amino acid metabolism in health and disease. *Sig Transduct Target Ther* 8, 345 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01569-3>
28. Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF, Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 82 (2010) 149–154.
29. Merritt JL 2nd, Norris M, Kanungo S. Fatty acid oxidation disorders. *Ann Transl Med.* 2018 Dec;6(24):473. doi: 10.21037/atm.2018.10.57. PMID: 30740404; PMCID: PMC6331364.
30. Wang Z, Guan D, Wang S, Chai LYA, Xu S, Lam KP. Glycolysis and Oxidative Phosphorylation Play Critical Roles in Natural Killer Cell Receptor-Mediated Natural Killer Cell Functions. *Front Immunol.* 2020 Feb 20;11:202. doi: 10.3389/fimmu.2020.00202. PMID: 32153568; PMCID: PMC7045049.
31. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Jul;71(14):2577-604. doi: 10.1007/s00018-013-1539-2. Epub 2013 Dec 21. PMID: 24363178; PMCID: PMC4059968.
32. Foretz, M., Guigas, B. & Viollet, B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. *Nat Rev Endocrinol* 19, 460–476 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00833-4>
33. Aft RL, Zhang FW, Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer.* 2002 Sep 23;87(7):805-12. doi: 10.1038/sj.bjc.6600547. PMID: 12232767; PMCID: PMC2364258.

34. Ding X, Fang T, Pang X, Pan X, Tong A, Lin Z, Zheng S, Zheng N. Mitochondrial DNA abnormalities and metabolic syndrome. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Mar 10;11:1153174. doi: 10.3389/fcell.2023.1153174. PMID: 36968196; PMCID: PMC10036395.
35. Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004 Apr;4(4):301-8. doi: 10.1038/nri1330. PMID: 15057788.
36. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008 Sep 1;112(5):1557-69. doi: 10.1182/blood-2008-05-078154. PMID: 18725574; PMCID: PMC2518872.
37. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:259-83. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095956. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23298210; PMCID: PMC3606674.
38. Wahl DR, Byersdorfer CA, Ferrara JL, Opipari AW Jr, Glick GD. Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation. *Immunol Rev.* 2012 Sep;249(1):104-15. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01148.x. PMID: 22889218; PMCID: PMC3422770.
39. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, McCormick LL, Fitzgerald P, Chi H, Munger J, Green DR. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity.* 2011 Dec 23;35(6):871-82. doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.021. PMID: 22195744; PMCID: PMC3248798.
40. Buttgerit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J.* 1995 Nov 15;312 ( Pt 1)(Pt 1):163-7. doi: 10.1042/bj3120163. PMID: 7492307; PMCID: PMC1136240.
41. Lindqvist LM, Tandoc K, Topisirovic I, Furic L. Cross-talk between protein synthesis, energy metabolism and autophagy in cancer. *Curr Opin Genet Dev.*

- 2018 Feb;48:104-111. doi: 10.1016/j.jgde.2017.11.003. Epub 2017 Nov 25. PMID: 29179096; PMCID: PMC5869074.
- 42.Mimitou EP, Lareau CA, Chen KY, Zorzetto-Fernandes AL, Hao Y, Takeshima Y, Luo W, Huang TS, Yeung BZ, Papalexi E, Thakore PI, Kibayashi T, Wing JB, Hata M, Satija R, Nazor KL, Sakaguchi S, Ludwig LS, Sankaran VG, Regev A, Smibert P. Scalable, multimodal profiling of chromatin accessibility, gene expression and protein levels in single cells. *Nat Biotechnol.* 2021 Oct;39(10):1246-1258. doi: 10.1038/s41587-021-00927-2. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34083792; PMCID: PMC8763625.
- 43.CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 561–563 (1970). <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- 44.Schmeing, T., Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 461, 1234–1242 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature08403>
- 45.Katunin VI, Muth GW, Strobel SA, Wintermeyer W, Rodnina MV. Important contribution to catalysis of peptide bond formation by a single ionizing group within the ribosome. *Mol Cell.* 2002 Aug;10(2):339-46. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00566-x. PMID: 12191479.
- 46.DiMauro, S. & Schon, E. A. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2656–2668 (2003).
- 47.Anderson, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
- 48.Kearns, T. P. & Sayre, G. P. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch. Ophthalmol.* **60**, 280–289 (1958).
- 49.Moraes, C. T. et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns–Sayre syndrome. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1293–1299 (1989).

50. Pearson, H. A. et al. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J. Pediatr.* **95**, 976–984 (1979).
51. Yu H, Jacquelot N, Belz GT. Metabolic features of innate lymphoid cells. *J Exp Med.* 2022 Nov 7;219(11):e20221140. doi: 10.1084/jem.20221140. Epub 2022 Oct 27. PMID: 36301303; PMCID: PMC9617479.