

Державний вищий навчальний заклад  
«Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника»  
Факультет природничих наук  
Кафедра біохімії та біотехнології

## **ДИПЛОМНА РОБОТА**

на здобуття освітнього рівня магістр

на тему:

**МОДУЛЯЦІЯ ТРАНСКРИПЦІЇ ГЕНІВ, ВІДПОВІДАЛЬНИХ ЗА  
РЕГУЛЯЦІЮ МЕТАБОЛІЗМУ, РЕАКЦІЇ НА СТРЕС І ЗАПАЛЕННЯ, ЧЕРЕЗ  
ТРАВМАТИЧНИЙ ДОСВІД І ДІСТУ, ДОПОВНЕНУ ПАРОСТКАМИ  
БРОКОЛІ**

Виконала: студентка II курсу магістратури,  
групи БХ-2(М)

спеціальності 091 Біологія та біохімія

Додон Дар'я Сергіївна

Керівник: к.б.н., доц. Господарьов Д.В.

Рецензент: асист. каф. Юркевич І. С.

**Додон Д.С. Модуляція транскрипції генів, відповідальних за регуляцію метаболізму, реакції на стрес і запалення, через травматичний досвід і дієту, доповнену паростками броколі.**

Дипломна робота на здобуття другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія».

Випускна робота магістра: с. 77, таблиць – 3, графічних зображень – 6, джерел – 187.

Дипломна робота присвячена вимірюванню рівня матричної РНК під впливом різних типів дієт та стресових факторів. Досліджено такі категорії генів, які кодують компоненти антиоксидантного захисту, системи детоксикації ксенобіотиків, а також білки, залучені в регуляцію метаболізму, запалення та автофагії.

**Ключові слова:** ген, експресія генів, миша,  $\alpha$ -кетоглютарат, проростки броколі, ПТСП.

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника

Факультет природничих наук

Кафедра біохімії та біотехнології

# **ДИПЛОМНА РОБОТА**

на здобуття освітнього рівня магістра

на тему:

**Біохімічні та гістологічні зміни у мишей за споживання проростків броколі**

**та**

**висококалорійної дієти**

Виконала: студентка II курсу магістратури,  
групи Бх-2(М)

спеціальності 091 Біологія та біохімія (ОП  
Біохімія)

Лабич Іванна Ярославівна

Керівник: д.б.н., проф. Байляк М.М.

Рецензент: д.б.н., проф. Семчишин Г.М.

## Анотація

### **Лабич І. Я. Біохімічні та гістологічні зміни у мишей за споживання проростків броколі та висококалорійної дієти.**

Дипломна робота на здобуття другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 091 «Біологія та Біохімія (освітня програма Біохімія)».

В роботі досліджено поокремий та сумісний вплив проростків броколі та висококалорійної їжі на основі так званих кафетерійних продуктів з високим вмістом жирів та легкодоступних вуглеводів (так звана «кафетерійна дієта») на метаболічні показники у самців мишей лінії *C57BL6/J*. Встановлено, що споживання кафетерійної дієти призводить до змін метаболічних показників у експериментальних тварин, зокрема до: вищого рівня глюкози, глікогену, триацилгліцеридів та нижчого рівня пероксидів ліпідів в печінці та вищої активності параоксонази у плазмі крові. Гістологічний аналіз тканини печінки виявив структурні зміни у мишей, що споживали кафетерійну дієту, зокрема наявність імунних клітин, що може вказувати на розвиток запалення. Загалом, результати свідчать про те, що кафетерійна дієта призводить до небажаних метаболічних змін у печінці та крові мишей, а проростки броколі демонструють здатність коригувати окремі метаболічні зміни, спричинені кафетерійною дієтою.

**Ключові слова:** кафетерійна дієта, проростки броколі, метаболічні показники, гістологічні зміни, печінка, миші.

### **Labych I. Y. Biochemical and histological changes in mice consuming broccoli sprouts and a high-calorie diet.**

Master's Thesis for obtaining the second (master's) level of higher education in the specialty 091 "Biology and Biochemistry (Educational Program Biochemistry)".

The study investigated the individual and combined effects of broccoli sprouts and a high-calorie diet based on so-called cafeteria products rich in fats and easily accessible carbohydrates (the so-called "cafeteria diet") on metabolic indicators in male *C57BL6/J* mice. It was found that the consumption of a cafeteria diet leads to changes in the metabolic parameters of experimental animals, specifically: higher levels of glucose, glycogen, and triacylglycerides; lower levels of lipid peroxides in the liver; and increased paraoxonase activity in blood plasma. Histological analysis of liver tissue revealed structural changes in mice fed the cafeteria diet, including the presence of immune cells, which may indicate the development of inflammation. Overall, the results suggest that the cafeteria diet leads to undesirable metabolic changes in the liver and blood of mice, while broccoli sprouts show the ability to correct certain metabolic changes induced by the cafeteria diet.

**Keywords:** cafeteria diet, broccoli sprouts, metabolic indicators, histological changes, liver, mice.

State higher educational institution  
Vasyl Stefanyk Precarpathian National University  
Faculty of Natural Sciences  
Department of Biochemistry and Biotechnology

**Thesis**

to obtain a master's degree

on the topic “**Role of CLPP protease in coping with proteotoxic stress in breast cancer**”

Presented by II year student, Bh-2(m)

Specialty: 091 Biology  
(educational program “Biochemistry”)

Nataliia O. Nechytailo

Supervisor:

Dmytro V. Gospodaryov

Supervisor:

Karolina Szczepanowska

Reviewer:

Volodymyr Shvadchak

Ivano-Frankivsk

2024

## АНОТАЦІЯ

**Нечитайло. Н.О. Роль протеази CLPP у подоланні протеотоксичного стресу у раку грудей.**

Дипломна робота на здобуття другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 091 «Біологія (освітня програма Біохімія)».

У дипломній роботі досліджується роль мітохондріальної протеази CLPP у відповідь на протеотоксичний стрес. Мітохондріальна система якості контролю білків складається із шаперонів та протеаз, серед яких важливими у забезпеченні мітохондріального білкового гомеостазу є протеази CLPP та LONP1. Ракові клітини існують у стані постійного протеотоксичного стресу спричиненого анеуплоїдією. Модельним об'єктом у дослідженні є клітинні лінії раку молочної залози MCF7.

Згідно аналізу даних на порталі DepMap, кількості копій генів CLPP та LONP1 позитивно корелюють у клітинних лініях раку молочної залози. Згідно проаналізованих даних із порталу TCGA, обидва гени частіше видаляються у різних видах раку, ніж ампліфікуються. Модель MCF7 з надекспресією CLPP (MCF7-OE<sup>CLPP</sup>) мала вищу чутливість до активатора CLPP – ONC201, ніж контрольна лінія. Окрім того, MCF7-OE<sup>CLPP</sup> була більш резистентною до індукування протеотоксичного стресу гамітрініб трифенілфосфоніум гексафлуорофосфатом (G-TPP). Це може свідчити про те, що надекспресія протеази CLPP покращує здатність MCF7 справлятися із протеотоксичним стресом. Окрім того, MCF7-OE<sup>CLPP</sup> була менш чутлива до інгібування LONP1, що може свідчити про взаємодію обох протеаз.

Зниження рівня CLPP методом нокдауну у клітинних лініях MCF7 було можливим лише до 30% від контрольного. Будь-які інші варіації в концентрації реагентів чи часі нокдауну призводили до клітинної загибелі. Позитивний вплив надекспресії CLPP і висока чутливість до пониження рівня протеази, можуть свідчити про залежність MCF7 від рівня CLPP.

Індукування анеуплоїдії реверсином спричиняє зміну клітинної локалізації мітохондрій, спричиняючи їх просторове наближення до ядра. Це

може бути пристосуванням клітин до протеотоксичного стресу, який міг виникнути через індукування анеуплоїдії. Білковий рівень мітохондріальних протеаз і їх субстратів після індукування анеуплоїдії був варіабельним, що унеможливило формування чітких висновків.

Загалом результати свідчать про те, що протеаза CLPP може бути важливою у пристосуванні клітинної лінії MCF7 раку молочної залози до протеотоксичного стресу.

**Ключові слова:**

Мітохондрія, CLPP, LONP1, рак, анеуплоїдія

## ANNOTATION

### **Nechytailo N.O. Role of CLPP protease in coping with proteotoxic stress in breast cancer.**

Master's Thesis for obtaining the second (master's) level of higher education in the specialty 091 "Biology (educational program Biochemistry)".

This study investigated the role of mitochondrial protease CLPP in response to proteotoxic stress. The mitochondrial protein quality control system comprises chaperones and proteases, among which are crucial in sustaining mitochondrial protein homeostasis are proteases CLPP and LONP1. Cancer cells exist under a constant proteotoxic stress state due to aneuploidy. The model system in this study is the MCF7 breast cancer cell line.

Based on DepMap portal data, CLPP and LONP1 copy numbers positively correlated in breast cancer cell lines. According to analyzed data from the TCGA portal, both genes are more significantly deleted than amplified in different cancer types. MCF7 model with CLPP overexpression (MCF7-OE<sup>Clpp</sup>) had higher sensitivity to CLPP activator ONC201 than the control line. Besides that, MCF7-OE<sup>Clpp</sup> was more resistant to proteotoxic stress induction with Gamitrinib triphenylphosphonium hexafluorophosphate (G-TPP). This can suggest that overexpression of CLPP can increase the MCF7 cell line's ability to cope with proteotoxic stress. Moreover, MCF7-OE<sup>Clpp</sup> was less sensitive to inhibition of LONP1, which can suggest interplay between proteases.

Decrease of CLPP levels by knockdown method in MCF7 cell line was possible only to 30% out of control level. Any other variations in reagents concentrations or knockdown time led to cell death. The positive impact of CLPP overexpression and high sensitivity to protease downregulation may suggest MCF7 dependency on CLPP levels.

Aneuploidy induction with reversine caused changes in the cellular localization of mitochondria, leading to their spatial closeness to the nucleus. This can suggest that cellular adaptation to proteotoxic stress may arise from aneuploidy induction. Protein levels of mitochondrial proteases and their substrates after

aneuploidy induction were variable which made it impossible to form clear conclusions.

In conclusion, acquired results suggest a potentially important role of CLPP in cellular adaptation to proteotoxic stress in the MCF7 breast cancer cell line.

**Key words:**

Mitochondria, CLPP, LONP1, cancer, aneuploidy

Vasyl Stefanyk Precarpathian National University  
Department of Biochemistry and Biotechnology

**MASTER THESIS**

**INVESTIGATING BATCH EFFECT AND CELL FATE DYNAMICS IN  
THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* INTESTINE USING SINGLE-CELL  
RNA VELOCITY**

Second-year student, Bch-2(M)

Speciality:

091 Biology and biochemistry

Kharuk Sviatoslav Vasylyovych

Supervisor:

Dr. Volodymyr V. Shvadchak

Research advisor:

Dr. Wolfgang Huber

Reviewer: Dr. Viktor V. Husak

## АНОТАЦІЯ

**Харук С.В. Дослідження технічних варіацій експерименту та динаміки розвитку клітин у кишечнику *Drosophila melanogaster* за допомогою швидкості РНК окремих клітин**

Дипломна робота на здобуття другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія (освітня програма Біохімія)».

Дане дослідження спрямоване на вивчення впливу підходів для інтеграції даних та динаміку розвитку клітин у кишечнику дрозофіли за допомогою секвенування РНК поодиноких клітин та визначення швидкості РНК. У дослідженні порівнювалися методи двох типів секвенування для визначення швидкості РНК поодиноких клітин, зокрема секвенування 5'- та 3'-кінців РНК. Була зроблена оцінка якості даних швидкості РНК та як вона впливає на здатність моделі правильно здійснювати аналіз. Також був представлений підхід до аналізу швидкості РНК та показано вплив інтеграції даних на виведення моделі швидкості РНК. Окрім того, було показано, що використання певних типів клітин для моделі впливає на виведення траєкторій, а також показано як нокаут гена *Notch* в кишечнику плодової мухи впливає на диференціацію клітин.

Основні результати цього дослідження свідчать про те, що дані 3'-секвенування дають значно кращу і надійнішу класифікацію зчитувань для швидкості РНК. Виходячи з цього, ми пропонуємо використовувати 3' секвеновані дані для аналізу швидкості РНК. Підхід з розділенням даних та їхня обробка окремо впливає на розділення умов у фазових портретах. Однак, поки що незрозуміло, чи покращує він їхню якість, оскільки нам бракує належного еталону для оцінки результатів моделі. Використання певних типів клітин для виведення моделі призвело до траєкторій, що відповідають попереднім біологічним знанням. Врешті-решт, показано, що нокаут гена *Notch* призвів до значних змін у поширеності типів клітин, надаючи перевагу ентероендокринній лінії.

**Ключові слова:** секвенування РНК поодиноких клітин, швидкість РНК поодиноких клітин, система CRISPR-Cas9, технічні варіації експерименту, граф

найближчих сусідів, ген *Notch*, стовбурові клітини, ентероендокринні клітини, середній кишечник *Drosophila melanogaster*.

## ANNOTATION

### **Kharuk S.V. Investigating batch effect and cell fate dynamics in the *Drosophila melanogaster* intestine using single-cell RNA velocity**

Master's Thesis for obtaining the second (masters) level of higher education in the specialty 091 "Biology and biochemistry (Educational Program Biochemistry)"

The study aims to investigate the impact of data integration approaches and cell dynamics in the *Drosophila* intestine using single-cell RNA sequencing and RNA velocity. The study compared two types of sequencing for single-cell RNA velocity, in particular, sequencing of the 5'- and 3'- ends of RNA. The quality of the RNA velocity data was assessed and how it affects the ability of the model to perform the analysis correctly. We also presented an approach to RNA velocity analysis and showed the impact of data integration on the output of the RNA velocity model. In addition, it was shown that the use of certain cell types for the model affects the trajectory inference, and it was shown how knocking out the *Notch* gene in the fruit fly gut affects cell differentiation.

The main results of this study indicate that 3'-sequencing data provide a much better and more reliable classification of reads for RNA velocity. Based on this, we propose to use 3' sequenced data for RNA velocity analysis. The approach of separating the data and processing them independently affects the distinction of conditions in the phase portraits. However, it is not yet clear whether it improves their quality, as we lack a proper reference to evaluate the model results. Using specific cell types for model inference resulted in trajectories that are consistent with previous biological knowledge. Finally, it was shown that knockdown of the *Notch* gene led to significant changes in the abundance of cell types favoring the enteroendocrine lineage.

**Keywords:** single-cell RNA sequencing, RNA velocity of single cells, CRISPR-Cas9 system, batch effect, k-nearest-neighbor graph (KNN), gene *Notch*, stem cells, enteroendocrine cells, *Drosophila melanogaster* midgut.

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника

Кафедра біохімії та біотехнології

## **ДИПЛОМНА РОБОТА**

на тему:

### **“КРОСЛІНКІНГ А-СИНУКЛЕЇНУ ПОЛІФЕНОЛАМИ БРОКОЛІ”**

Студента II курсу, групи Бх-2(М)  
Спеціальності: 091 “Біологія та біохімія”

**Штурмака Андрія Васильовича**

Керівник: доц. Швадчак В.В.

Рецензент: д.б.н., професорка Байляк М.М.

м. Івано-Франківськ – 2024 рік

## Анотація

### **Штурмак А. В. Крослінкінг $\alpha$ -синуклеїну поліфенолами броколі.**

Дипломна робота на здобуття другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 091 “Біологія та Біохімія (освітня програма Біохімія)”.

В роботі досліджено утворення димерів та олігомерів амілоїдогенного білка  $\alpha$ -синуклеїну внаслідок дії поліфенолів, кверцетину та галлової кислоти. Було відомо, що присутність цих поліфенолів пригнічує утворення амілоїдних фібрил *in vitro*. В цій роботі показано, що така інгібуюча активність виникає за рахунок крослінкінгу  $\alpha$ -синуклеїну продуктами окислення поліфенолів в димери та вищі олігомери, які здатні зв'язуватися з кінцями амілоїдних фібрил з наномолярною афінністю та блокувати їх видовження.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -синуклеїн, поліфеноли броколі, олігомери, крослінкінг, амілоїди, інгібітори.

## Annotation

### **Shturmak A. V. Crosslinking of $\alpha$ -synuclein by broccoli polyphenols.**

Diploma thesis for obtaining the second (master's) level of higher education in specialty 091 “Biology and Biochemistry (Education Program Biochemistry)”.

The study investigates the formation of dimers and oligomers of the amyloidogenic protein  $\alpha$ -synuclein under the influence of polyphenols, quercetin and gallic acid. These polyphenols were known to inhibit the growth of amyloid fibrils *in vitro*. In this study, we show that this inhibitory activity is a result of  $\alpha$ -synuclein crosslinking by polyphenol oxidation products into dimers and higher oligomers. The oligomers bind to the ends of amyloid fibrils with nanomolar affinity and block their elongation.

**Keywords:**  $\alpha$ -synuclein, broccoli polyphenols, oligomers, crosslinking, amyloids, inhibitors.