

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

ДОМЕ АНТОН СЕРГЕЕВИЧ

---

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**  
**об основных результатах**  
**выполненной научно-квалификационной работы**

**Разработка стратегий подавления экспрессии опухоль-  
ассоциированных генов с использованием систем геномного  
редактирования**

Направление подготовки	06.06.01 Биологические науки
Направленность	1.5.3 Молекулярная биология

Аспирант	Доме А.С.
Научный руководитель	д.х.н., проф., акад. РАН Власов В.В.
Соруководитель	к.х.н. Степанов Г.А.

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в лаборатории геномного редактирования ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель: **Власов Валентин Викторович**, доктор химических наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Соруководитель: **Степанов Григорий Александрович**, кандидат химических наук, заведующий лабораторией геномного редактирования Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность исследования.**

Глиобластома (астроцитомы IV степени злокачественности) представляет собой наиболее распространенную и агрессивную первичную злокачественную опухоль головного мозга, характеризующуюся средней выживаемостью пациентов около 15 месяцев[1]. Несмотря на комплексный подход к лечению, включающий хирургическую резекцию опухоли, лучевую и химиотерапию темозоломидом, пятилетняя выживаемость пациентов остается критически низкой – менее 10%. Традиционные методы лечения обладают значительными иммуносупрессивными побочными эффектами, что подчеркивает острую необходимость в разработке новых, более эффективных и безопасных терапевтических стратегий[2].

В последние годы иммунотерапия демонстрирует значительный прогресс и становится одним из наиболее перспективных направлений в лечении онкологических заболеваний, включая глиобластому. В частности, активно развивается направление онколитической виротерапии, основанное на использовании вирусов, способных избирательно поражать и уничтожать опухолевые клетки[3]. Терапевтический эффект онколитических вирусов реализуется как путем прямого лизиса опухолевых клеток, так и опосредованно – через активацию противоопухолевого иммунного ответа. Более того, онколитические вирусы могут служить эффективными векторами для доставки терапевтических генов в опухолевые клетки, что открывает широкие возможности для комбинированных подходов к лечению.

В настоящее время всё более широко используются системы редактирования генома на основе CRISPR/Cas[4]. Появление таких систем позволило целенаправленно вносить двухцепочечные разрывы в ДНК, регулируя экспрессию генов на уровне транскрипции. Постоянно ведется поиск новых белков семейства Cas, что открывает новые способы специфично регулировать реализацию генетической информации. Так, одними из последних были описаны белки Cas13, которые в комплексе с направляющими РНК специфически гидролизуют одноцепочечные РНК, что дало доступ к эффективной и специфичной регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне[5].

### **Цель и задачи исследования.**

Целью данной работы являлась разработка стратегий регуляции экспрессии опухоль-ассоциированных генов с использованием систем редактирования генома

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести биоинформатический анализ данных транскриптомного исследования экспрессии генов в линиях клеток U87-MG и НЕВ, определить опухоль-ассоциированные транскрипционные факторы и выбрать гены-мишени для подавления экспрессии.

2. Разработать и собрать системы направленного нокдауна на основе CasRx для эффективного подавления экспрессии целевых генов, включая конструирование плазмид и получение лентивирусных частиц.

3. Получить клеточные линии с CasRx-индуцированной системой нокдауна и оценить эффективность подавления экспрессии выбранных на уровне мРНК.

4. Начать работу над созданием рекомбинантного онколитического вируса на основе вируса осповакцины.

### **Научная новизна и практическая значимость.**

В данной работе была применена система нокдауна на основе CRISPR/CasRx в отношении клеток глиобластомы.

Был проведён биоинформатический анализ результатов транскриптомного исследования культур клеток глиобластомы с использованием как открытых данных на постоянных культурах, так и панели клеточных линий, полученных к.б.н. Васильевой Н.С. в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН.

Из полученных результатов анализа, а также из экспериментальных данных впервые были обнаружены гены JUN, STAT3, XIAP и PD-L1 как потенциальные регуляторы чувствительности клеток глиобластомы к VV-GMCSF-Lact.

Впервые показано снижение уровня мРНК целевых генов в клетках глиобластомы U87MG с помощью системы нокдауна на основе CRISPR/CasRx.

### **Личный вклад автора.**

Основная часть работ была выполнена автором лично, либо с его непосредственным участием. Биоинформатический анализ был проведен совместно с сотрудником лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины к.х.н. Семеновым Дмитрием Владимировичем.

### **Апробация работы.**

По результатам данного исследования опубликовано 6 работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК; 3 тезисов в сборниках тезисов симпозиумов и конференций.

### **Благодарности.**

Автор выражает благодарность Семёнову Дмитрию Владимировичу за помощь в проведении биоинформатического анализа данных, Васильевой Наталье Сергеевне за предоставление экспериментальных данных о генах-мишенях, а также Муханову Владимиру Сергеевичу, Карицкой Полине Евгеньевне и Бейркдар Ахмаду за существенный вклад в проделанную работу.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Методы исследования.

#### 1. Биоинформатический анализ и определение генов-мишеней

Данные для анализа дифференциальной экспрессии между образцами клеточных линий U87-MG и НЕВ брали из NCBI; PRJNA310001, GEO: GSE77307. В качестве референсного генома использовали кДНК человека версии GRCh38. В обработке результатов использовали инструменты FastQC, MultiQC, Trimmomatic, kallisto, пакеты Bioconductor DESeq2, clusterProfiler, EnhancedVolcano, ComplexHeatmap, enrichplot. Для визуализации результатов использовали инструмент ggplot2. Поиск транскрипционных факторов, ассоциированных с глиобластомой, проводили с использованием веб-ресурса Enrichr с использованием библиотек «*Transcription Factor PPIs*» и «*ENCODE and ChEA Consensus TFs from ChIP-X*».

#### 2. Подбор направляющих РНК разными сервисами

Подбор направляющих РНК, направленных на мРНК транскрипционных факторов JUN и STAT3, а также гена CD274, производился с помощью трех независимых веб-ресурсов: TIGER[6], rnatargeting[7] и deerCas13[8].

#### 3. Клонирование эффекторных плазмид

В качестве эффекторного вектора использовали плазмиду pLentiRNACRISPR\_005-hU6-DR\_BsmBI-EFS-RfxCas13d-NLS-2A-Puro-WPRE (pRxP) (138147, Addgene, США). Встройку олигонуклеотидов, кодирующих направляющие РНК, осуществляли по сайтам BsmBI методом GoldenGate. Встройку флуоресцентного белка mKate2 для получения плазмиды pRxP-mKate2 осуществляли по сайту рестрикции BamHI.

#### 4. Работа с лентивирусами

Наработку лентивирусных частиц производили с помощью кальций-фосфатной трансфекции клеток-паковщиков HEK293T/17 плазмидами pRxP, pMD2.G, psPAX2. Концентрировали частицы ультрацентрифугированием. Функциональный титр вирусных частиц определяли с помощью проточной цитофлуориметрии или ПЦР на геном вируса.

#### 5. Получение трансгенных клеточных линий

Для получения клеточных линий, экспрессирующих систему нокдауна, на основе U87MG, клетки рассеивали в шестилуночные планшеты и проводили трансдукцию 10 мкл концентрированного вируса. Отбор трансдуцированной популяции производили с помощью пурамициновой селекции или FACS.

#### 6. Верификация нокдауна

Уровень нокдауна целевых генов-мишеней измеряли с помощью RT-qPCR, в качестве нормировочного гена использовали GAPDH.

## 7. Дизайн плазмиды для Vaccinia virus

Пайплайн генноинженерных работ для получения рекомбинантной плазмиды pXJP-R7,5\_synth\_VACV\_CasRx\_mKate2 разрабатывали в ПО SnapGene. Рамки считывания CasRx и mKate2 получали путем ПЦР с плазмидных конструкций с использованием высокоточных полимераз. Фрагмент VACV\_synth получали путём ПЦР-синтеза из олигонуклеотидов, сформированных с помощью веб-ресурса Primerize[9].

## Результаты и обсуждение.

### Биоинформатический анализ данных РНК-секвенирования нового поколения с целью выбора потенциальных опухоль-ассоциированных генов-мишеней

Первичная обработка «сырых» транскриптомных данных включала в себя повышение качества исследуемых транскриптов с помощью программы Trimmomatic, а также псевдовыравнивание транскриптов на предварительно проиндексированный геном человека версии GRCh38. На рисунке 1 изображен пайплайн обработки данных РНК-секвенирования нового поколения, иллюстрирующий основные этапы обработки образцов.

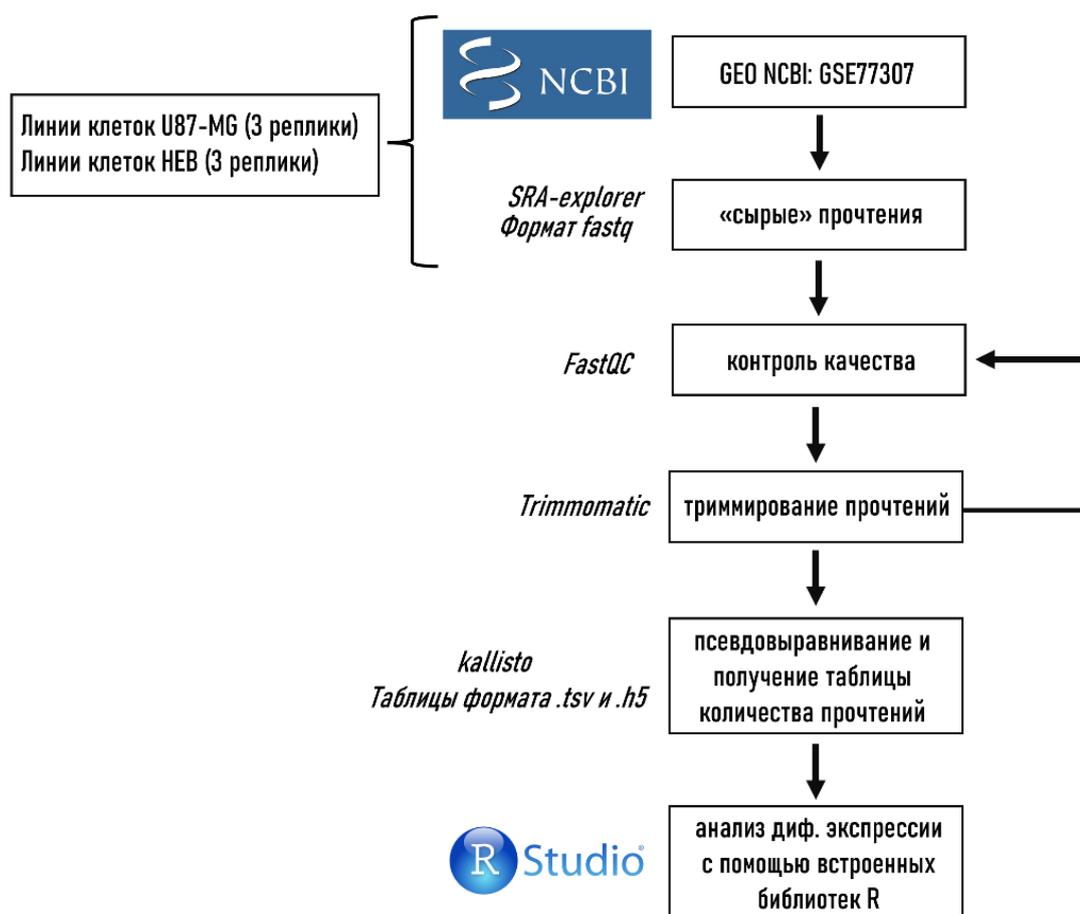


Рисунок 1. Пайплайн обработки данных РНК-секвенирования.

Верификацию данных проводили с помощью графиков из встроенных пакетов Bioconductor: clusterProfiler, EnhancedVolcano, ComplexHeatmap, enrichplot, biomaRt.

Для проверки и визуализации различий в экспрессии генов между клеточными линиями U87-MG и HEV была построена теплокарта уровня экспрессии генов в исследуемых образцах (см. рисунок 2).

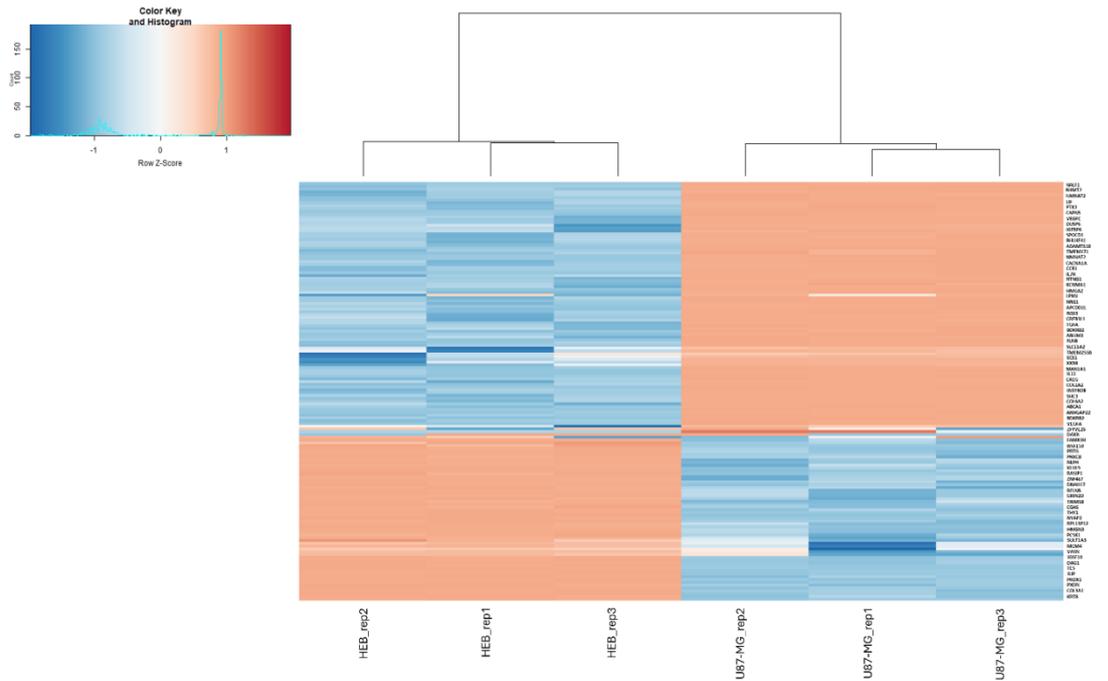


Рисунок 2. Теплокорта уровня экспрессии 70 генов, которые имеют сходные профили экспрессии в клеточных линиях U87-MG и образцами клеточной линии эмбрионального мозга человека НЕВ. Для построения тепловой карты значения экспрессии были масштабированы с помощью Z-оценки (Z-score).

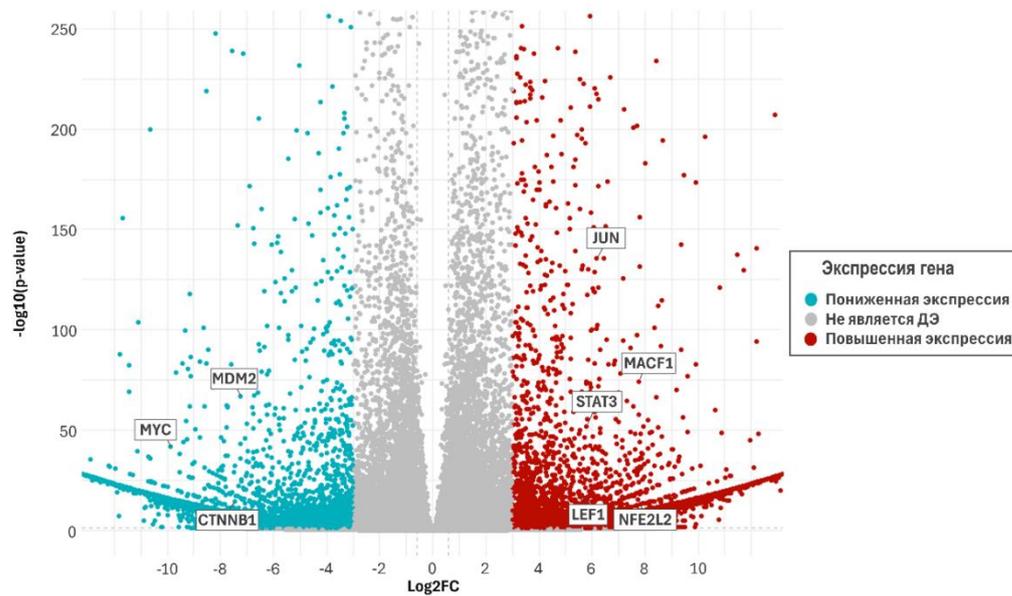


Рисунок 3. Вулканический график (Volcano plot). По оси Y отложена шкала  $-\log_{10}(p\text{-value})$ , а по оси X -  $\log_2\text{FoldChange}$ , показывающая степень изменения экспрессии гена. Рамками на графике обозначены транскрипционные факторы семейства JUN.

Полученные выборки генов с повышенной (8561 ген) и пониженной экспрессией (6853 ген) были импортированы в Enrichr для поиска семейств транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию данных генов. По данным библиотеки «Transcription\_Factor\_PPIs» количество транскрипционных факторов семейства JUN составило 27 генов (p-value = 0.025).

Из 27 генов, кодирующих транскрипционные факторы, было отобрано 5 генов с повышенной экспрессией (STAT3, NFE2L2, JUN, LEF1, MAFK1) и 3 гена с пониженной экспрессией (CTNNB1, MYC, MDM2), которые показали наиболее сильное изменение экспрессии. Результаты сравнения между клеточными линиями U87-MG и HEB приведены в виде графиков «ящик с усами» (boxplot) на рисунке 4. По оси Y отражено  $\text{Log}_2$ (нормировочное количество прочтений). В качестве метода нормализации использовали «DESeq2's median of ratios» (медиана отношений DESeq2).

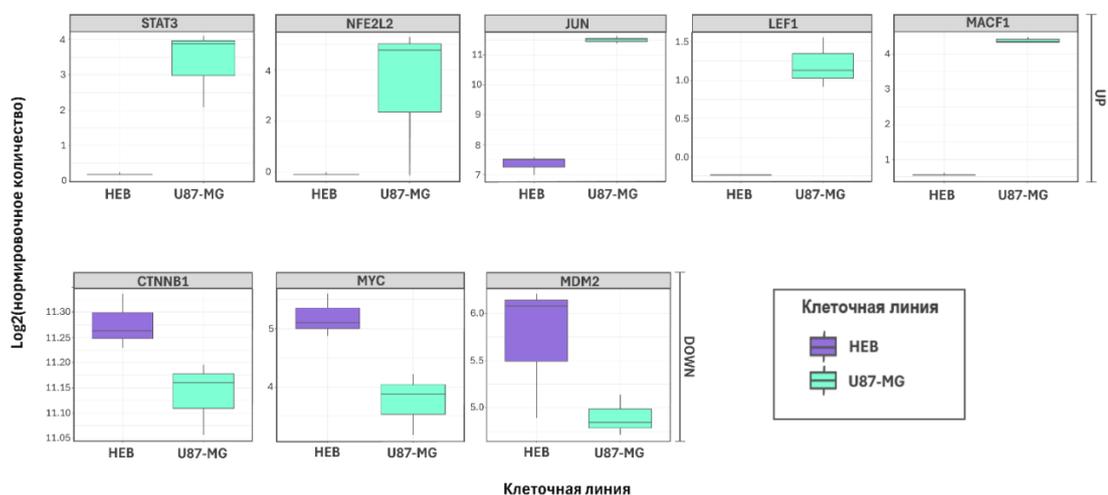


Рисунок 4. Графики “ящик с усами” для наиболее дифференциально экспрессирующихся генов транскрипционных факторов семейства JUN. Все гены на рисунке соответствуют критериям отбора DESeq2: p-value < 0.05.

Кроме того, биоинформатический анализ транскриптомных данных, включающих как U87 MG, так и персонализированные клеточные культуры, полученные в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН к.б.н. Васильевой Натальей Сергеевной, выявил транскрипционный фактор STAT3 и ассоциированные с ним гены как повышающие экспрессию при формировании нейросфер и способствующие эпителиально-мезенхимальному переходу, а также инвазии и миграции клеток глиобластомы.

Таким образом, с помощью биоинформатического анализа данных РНК-секвенирования нового поколения удалось обнаружить 5 транскрипционных факторов семейства JUN, ассоциированных с развитием глиобластомы, и способные выступить

потенциальными мишенями для специфичного нокдауна с помощью системы CRISPR/CasRx.

По результатам анализа литературы, учитывая растущую популярность иммунотерапии как онколитическими вирусами[10], так и ингибиторами контрольных точек[11], был выбран ген-мишень PD-L1. Терапия ингибиторами PD-L1[12], в том числе в составе онколитического вируса в качестве трансгена[13], показывает высокую эффективность в отношении солидных опухолей.

Большой интерес в исследовании механизмов развития глиобластомы и её устойчивости к терапии вызывает ген ингибитора апоптоза XIAP. Так, показано, что XIAP может вызывать резистентность клеток глиобластомы к программируемой клеточной гибели[14–16]. Кроме того, известно о его роли в развитии других солидных опухолей[17,18]. В рамках данной работы важно заметить, что ингибирование XIAP усиливает эффект от терапии анти-PD-L1 антителами в мышинных моделях солидных опухолей[19]. Учитывая приведенные данные, мРНК XIAP также была выбрана в качестве мишени для системы CasRx.

#### **Подбор направляющих РНК**

Направляющие РНК на гены мишени подбирали в трёх вариантах на белок-кодирующие участки каждого гена[20]. Так, на мРНК XIAP были подобраны 3 направляющие РНК исходя из предсказанной с помощью сервиса RNAFold пространственной структуры. Для нацеливания были выбраны три участка рамки считывания с наименьшей свободной энергией. Подбор направляющих РНК на мРНК PD-L1 осуществлялся с помощью веб-ресурса deerCas13, а на JUN и STAT3 – с помощью веб-ресурсов deerCas13, mnatargeting и TIGER.

Таблица 1. Предсказанные молекулы направляющих РНК с помощью инструмента mnatargeting и их параметры «SCORE».

<b>Название sgRNA</b>	<b>Score</b>
sgJUN_2	0.9396
sgSTAT3_1	0.9814

Таблица 2. Предсказанные молекулы направляющих РНК с помощью инструмента TIGER и их параметры «Guide Score».

<b>Название sgRNA</b>	<b>Guide Score</b>
sgJUN_3	0.9839
sgSTAT3_3	0.9919

Таблица 3. Предсказанные молекулы направляющих РНК с помощью инструмента deepcas13 и их параметры «DeepScore» и «Lentiviral Deficiency Score».

Название sgRNA	DeepScore	Lentiviral Deficiency Score
sgJUN_1	0.8975	-0.0407
sgSTAT3_2	0.8931	0.0625
g29 (PD-L1)	0.934279728	0.012048752
g150 (PD-L1)	0.890287948	0.559902795
g393 (PD-L1)	0.909388745	-0.02106156

### Клонирование эффекторных плазмид.

В качестве эффекторного вектора для лентивирусной доставки системы gRNA-CasRx использовали плазмиду pLentiRNACRISPR\_005-hU6-DR\_BsmBI-EFS-RfxCas13d-NLS-2A-Puro-WPRE (pRxP) (138147, Addgene, США). Встройку олигонуклеотидов, кодирующих направляющие РНК, осуществляли по сайтам рестрикции для BsmBI методом GoldenGate. Встройку флуоресцентного белка mKate2 для получения плазмиды pRxP-mKate2 осуществляли по сайту рестрикции BamHI. Рамку считывания mKate2 нарабатывали с помощью ПЦР с использованием высокоточных полимераз. В олигонуклеотиды для ПЦР-синтеза кодирующей последовательности mKate2 также были добавлены последовательности пептида T2A на 5'-конце и линкера GSG на 3'-конце. Все произведенные сборки подтверждались секвенированием по Сэнгеру.

### Сборка и верификация лентивирусных частиц

Сборку rVSV-G-псевдотипированных лентивирусных частиц проводили на 10см чашках Петри путём кальций-фосфатной трансфекции клеточной линии HEK293T/17. В качестве трансферных плазмид использовали плазмиды pRxP (Рисунок П1) или pRxP-mKate2 (Рисунок П2) со встроенными последовательностями направляющих РНК (g29, g150, g393 для PD-L1; gXIAP1, gXIAP2, gXIAP3 для XIAP; gJUN1, gJUN2, gJUN3 для JUN; gSTAT3-1, gSTAT3-2, gSTAT3-3 для STAT3). Через 72 часа собирали супернатант, фильтровали через 0,45мкм PES фильтр и концентрировали ультрацентрифугированием при 120 000 g, затем ресуспендировали осадок в холодном PBS с 1% BSA. Аликвоты полученных вирусных частиц по 20мкл хранили на -80°C.

Определение функционального титра лентивирусных частиц, содержащих кодирующую последовательность mKate2, определяли методом проточной цитофлуориметрии. Для этого к рассаженным по 100 тысяч клеток на лунку 24-луночного планшета клеткам HEK293T/17 в трех приливали 200 или 300мкл неконцентрированной

вирусной суспензии. Через 48 часов проводили проточную цитофлуориметрию.

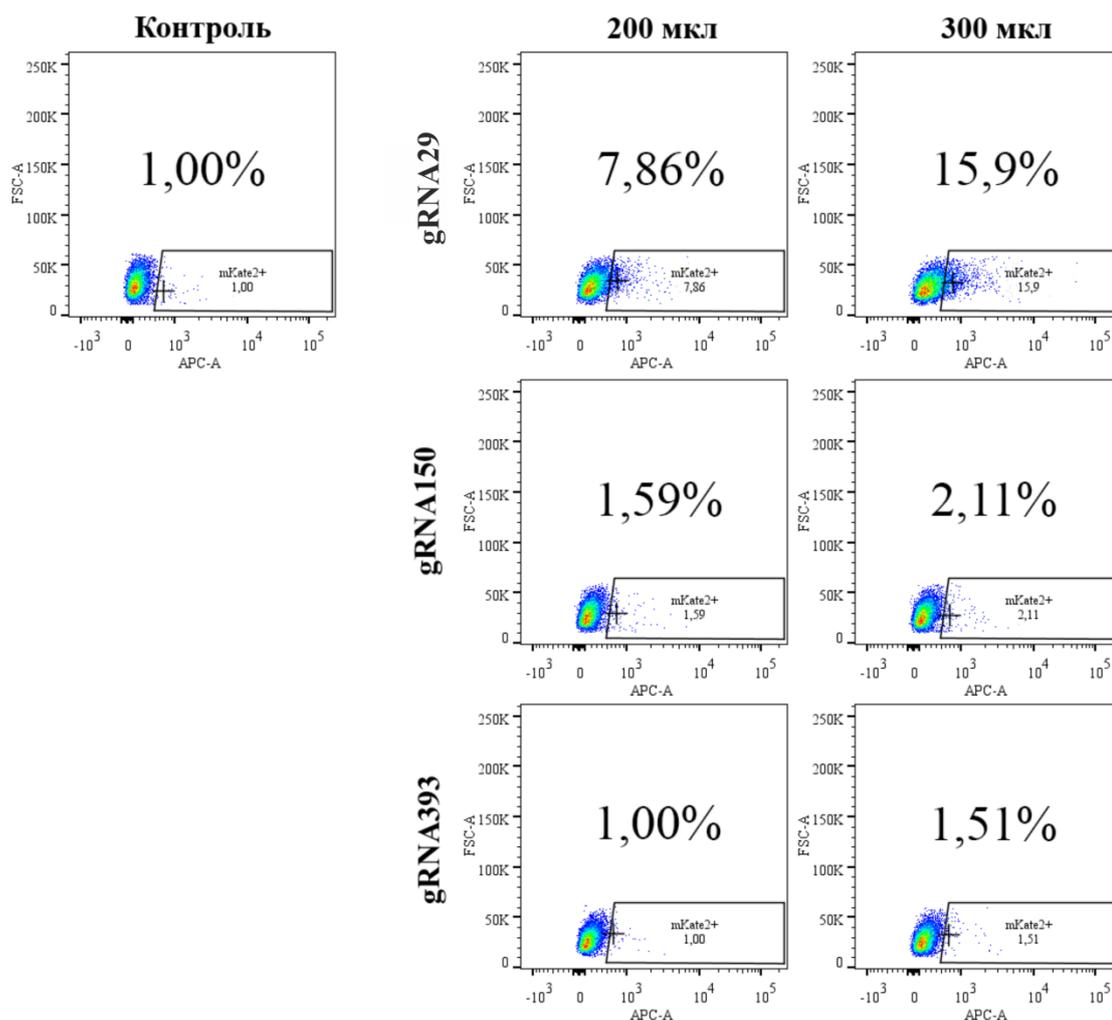


Рисунок 5. Результаты цитофлуориметрического анализа клеток линии HEK293T/17, трансдуцированных неконцентрированными лентивирусными частицами с gRNA29, gRNA150, gRNA393. На рисунке представлены популяции одиночных клеток. Цифрами обозначены проценты (%) положительных по APC-A клеток в популяции. Контроль – контрольный образец без добавления вирусного супернатанта. 200 мкл, 300 мкл – образцы, к которым было добавлено соответствующее количество вирусного супернатанта. mKate2+ - субпопуляция клеток линии HEK293T/17, экспрессирующей флуоресцентный маркер mKate2.

Цитофлуориметрический анализ выявил прямую зависимость между объемом вирусного супернатанта и долей трансдуцированных клеток, что согласуется с ранее опубликованными данными [48]. Примечательно, что доля клеток, трансдуцированных вирусными частицами с gRNA29, составила 7,86%, что существенно превышает аналогичные показатели для вирусных частиц с gRNA150 (1,59%) и gRNA393 (1,00%). Данное наблюдение может быть обусловлено неспецифическими взаимодействиями между gRNA и белком CasRx, потенциально влияющими на эффективность сборки вирусных

частиц или экспрессию флуоресцентного белка mKate2, что, в свою очередь, отражается на результатах цитофлуориметрического анализа.

Для количественной оценки эффективности трансдукции был проведен расчет функционального титра лентивирусных частиц, выраженного в трансдуцирующих единицах на миллилитр (ТЕ/мл). Использовалась следующая формула:

$$\frac{\text{ТЕ}}{\text{мл}} = \frac{\text{Число клеток} \times \% \text{ трансдуцированных клеток (экспрессирующих флуоресцентный маркер)}}{\text{Объем вирусной суспензии (мл)}}$$

Процент трансдуцированных клеток варьировал в зависимости от объема вирусной суспензии и наличия gRNA. Для объема 0,200 мл средние значения составили 6,92%, 1,42% и 1,00% для вирусных частиц с gRNA29, gRNA150 и gRNA393 соответственно. При объеме 0,300 мл эти показатели достигли 16,6%, 2,17% и 1,42% соответственно.

На основе полученных данных были рассчитаны средние функциональные титры для двух концентраций вирусной суспензии:

1. Вирусные частицы с gRNA29:  $(4,50 \pm 1,46) \times 10^6$  ТЕ/мл
2. Вирусные частицы с gRNA150:  $(5,98 \pm 1,77) \times 10^5$  ТЕ/мл
3. Вирусные частицы с gRNA393:  $(4,01 \pm 1,01) \times 10^5$  ТЕ/мл

Полученные титры существенно ниже среднего титра неконцентрированных вирусных частиц, получаемого при использовании стандартных протоколов (приблизительно  $1 \times 10^7$  ТЕ/мл) [49,50].

Наблюдаемое снижение титра может быть обусловлено рядом факторов:

1. Сложность экспрессируемой кассеты и потенциально неполная эффективность работы 2А пептидов. Это может приводить к снижению экспрессии флуоресцентного маркера и, как следствие, к занижению определяемого титра[21]. Неоптимальная работа 2А пептидов может проявляться в неполном расщеплении полипротеина, что влияет на количество детектируемого флуоресцентного белка mKate2.

2. Влияние длины встраиваемого трансгена на титр вируса. В данном исследовании использовались плазмиды с трансгенами длиной около 7000 нуклеотидов, что может негативно сказываться на эффективности наработки вируса[22]. Известно, что увеличение размера генетической конструкции, встраиваемой в лентивирусный вектор, обратно пропорционально влияет на эффективность упаковки вирусных частиц и, соответственно, на конечный титр вируса.

Для повышения титра вирусных частиц в дальнейших исследованиях могут быть рассмотрены следующие стратегии:

1. Оптимизация последовательностей 2A пептидов для повышения эффективности расщепления полипротеина.

2. Использование альтернативных промоторов или энхансеров для усиления экспрессии трансгенов.

3. Применение методов концентрирования вирусных частиц, таких как ультрацентрифугирование или тангенциальная фильтрация.

4. Модификация протокола трансфекции клеток-продуцентов для повышения эффективности наработки вирусных частиц.

5. Исследование возможности разделения крупной генетической конструкции на несколько меньших, которые могут быть доставлены в клетки-мишени с помощью ко-трансдукции.

Далее было принято решение отказаться от использования вектора с mKate2 ввиду его большого размера, низкой эффективности трансфекции клеток-паковщиков, а также низкого функционального титра лентивирусных частиц. Все направляющие РНК были переклонированы в исходный плазмидный вектор (Рисунок П1), содержащий в качестве маркера селекции ген пурамициновой N-ацетилтрансферазы. Ввиду отсутствия компонента T2A-mKate2 вектор имеет меньший размер, что потенциально положительно сказывается на титре получаемых лентивирусных частиц и их функциональности.

Титр концентрированных лентивирусных частиц определяли методом ПЦР в реальном времени на геномной ДНК трансдуцированных клеток до начала отбора по пурамицину. В результате получили следующие значения копий вирусного генома на геном клетки:

<b>Образец</b>	<b>Количество копий WPRE на геном</b>
gJUN1	3,2±0,5
gJUN2	1±0,2
gJUN3	1,6±0,1
gSTAT3-1	6,05±0,75
gSTAT3-2	11,05±2,55
gSTAT3-3	4±1,5
g29	128±63
g150	22±3
g393	32±1
RxP	9±0,75

Видно, что лентивирусные частицы, содержащие CasRx и направляющие РНК на мРНК гена PD-L1, отличаются большим титром по сравнению с остальными. Предположительно это связано с тем, что ген PD-L1 менее жизненно важен для клеток, в том числе клеток-паковщиков, чем транскрипционные факторы семейства JUN, что обеспечивает наработку вируса клетками-паковщиками в высоких титрах, а также множественную интеграцию системы в геном клеток U87MG.

#### **Получение трансгенных клеточных линий.**

Трансдукцию клеток U87MG проводили следующим образом: клетки рассеивали по 150 тысяч на лунку шестилуночного планшета. В суспензию вносили по 10 мкл концентрированного вируса. Для каждой направляющей РНК было предусмотрено 2 биологических повтора.

Через 24 часа после трансдукции производили смену среды. Ещё через 24 часа начинали отбор популяции трансдуцированных клеток по пурамицину. Для этого в каждую лунку добавляли пурамицин в конечной концентрации 1 мкг/мл. Через 48 часов меняли среду, увеличив концентрацию пурамицина до 2 мкг/мл. Отбор производили до полной гибели клеток в лунках с нетрансдуцированным контролем.

#### **Верификация нокдауна.**

По окончании отбора выделяли РНК из клеточных лизатов и проводили одностадийную RT-qPCR. Относительное изменение количества исследуемой мРНК вычисляли методом  $\Delta\Delta Cq$  с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad, США). Нормализацию результатов ПЦР проводили на ген домашнего хозяйства GAPDH.

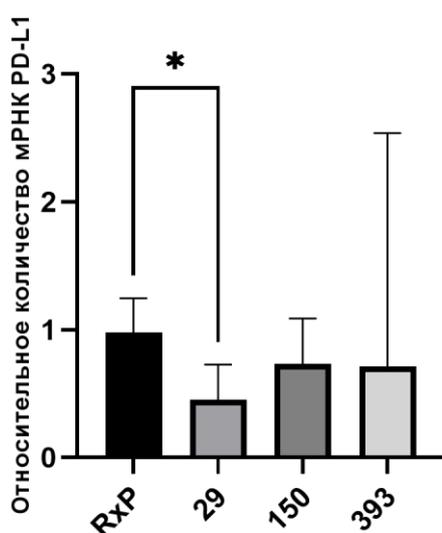


Рисунок 6. Изменение уровня экспрессии мРНК гена PD-L1 в клетках глиобластомы человека U87 MG после нокдауна с помощью CasRx. RxP – клетки, трансдуцированные

вирусами без направляющей РНК. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  95% доверительным интервалом. Сравнения групп проводили с помощью однофакторной ANOVA с последующим тестом Даннета. \* - статистически значимые различия при  $p$  value = 0.05.

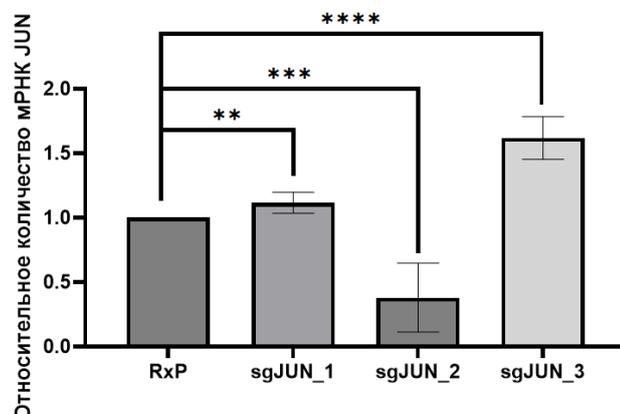


Рисунок 7. Изменение уровня экспрессии мРНК JUN в клетках глиобластомы человека U87 MG после нокдауна с помощью CasRx. RxP – клетки, трансдуцированные вирусами без направляющей РНК. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  95% доверительным интервалом. Сравнения групп проводили с помощью однофакторной ANOVA с последующим тестом Даннета. \* - статистически значимые различия при  $p$  value = 0.05.

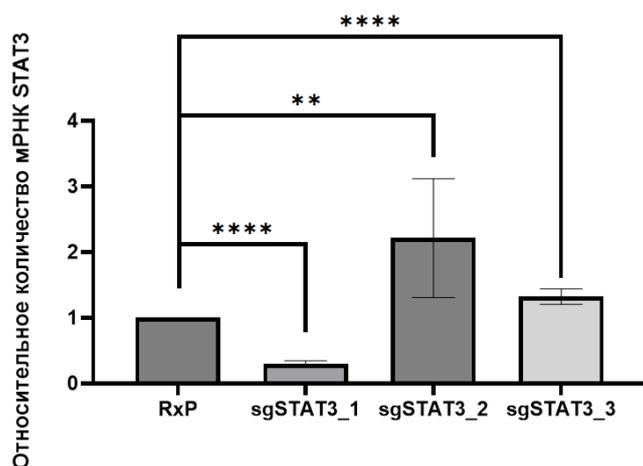


Рисунок 8. Изменение уровня экспрессии мРНК STAT3 в клетках глиобластомы человека U87 MG после нокдауна с помощью CasRx. RxP – клетки, трансдуцированные вирусами без направляющей РНК. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  95% доверительным интервалом. Сравнения групп проводили с помощью

однофакторной ANOVA с последующим тестом Даннета. \* - статистически значимые различия при  $p$  value = 0.05.

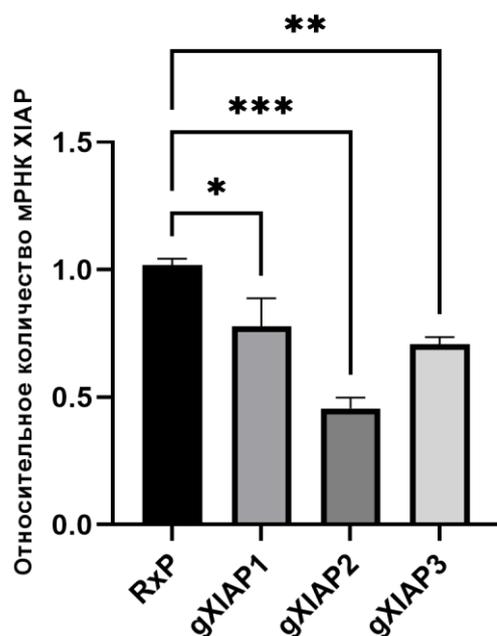


Рисунок 9. Изменение уровня экспрессии мРНК XIAP в клетках глиобластомы человека U87 MG после нокдауна с помощью CasRx. RxP – клетки, трансдуцированные вирусами без направляющей РНК. Данные представлены в виде среднего с  $\pm$  95% доверительным интервалом. Сравнения групп проводили с помощью однофакторной ANOVA с последующим тестом Даннета. \* - статистически значимые различия при  $p$  value = 0.05.

При подборе направляющих РНК использовались различные подходы и сервисы. Так, для всех направляющих РНК на мРНК XIAP удалось добиться достоверного снижения уровня целевой мРНК. Максимальное снижение мРНК XIAP составило 54% для gXIAP2.

Добиться выраженного снижения уровня мРНК целевых генов PD-L1, JUN и STAT3 удалось только для одной направляющей РНК из трёх в каждом случае. При анализе видно, что g29 для мРНК PD-L1 обладала наилучшими характеристиками по данным сервиса deerCas13, что подтвердилось экспериментально (снижение уровня мРНК составило 55%). Наиболее эффективные направляющие РНК для генов JUN (снижение на 62%) и STAT3 (снижение на 70%) объединяет то, что они были подобраны с помощью сервиса gnatargeting, предлагающего 30-нуклеотидные последовательности направляющих РНК вместо более распространенных 23-нуклеотидных. В литературе присутствуют данные о том, что 30-нуклеотидные направляющие РНК обеспечивают более стабильный третичный комплекс[23].

Таким образом, для всех генов-мишеней удалось добиться статистически значимого нокдауна.

#### **Дизайн и сборка плазмиды для получения рекомбинантного *Vaccinia virus*.**

Вектор pXJP-P7,5synth (Рисунок П3), содержащий плечи гомологии гена tk *Vaccinia virus*, был предоставлен Сиволобовой Галиной Федоровной из ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Далее путем удаления сайта BsmBI с помощью overlap PCR и последующего клонирования была получена плазида pXJP-P7,5synth\_mod. Затем в плазмиду pXJP-P7,5synth\_mod по сайтам SalI и Sfr274I была встроена синтетическая последовательность для экспрессии короткой направляющей РНК под вирусным промотором, содержащая PE/L промотор, DR (direct repeat) CasRx, кассету для встройки направляющей РНК методом GoldenGate, а также рибозимы NHR и HDV на 5' и 3'-концах соответственно (рисунок П5). Затем по сайтам AsuNI и HindIII был встроен фрагмент CasRx-T2A-mKate2. Полученная плазида pXJP-P7,5synth\_mod\_CasRx\_mKate2 (Рисунок П4) будет использована для встройки высокоэффективных направляющих РНК на гены-мишени, ассоциированные с развитием глиобластомы и устойчивостью к *Vaccinia virus*, и последующего получения рекомбинантного вируса осповакцины.

## **ВЫВОДЫ**

1. Проведен биоинформатический анализ данных сравнительного транскриптомного исследования экспрессии генов клеточных линий U87-MG и НЕВ. В качестве мишеней определены опухоль-ассоциированные транскрипционные факторы JUN и STAT3. Из экспериментальных и литературных данных также выбраны гены-мишени XIAP и PD-L1.
2. Разработаны и получены лентивирусные частицы, несущие систему геномного редактирования на основе CasRx для подавления экспрессии целевых генов: JUN, STAT3, XIAP и PD-L1. Оценен их функциональный титр.
3. Получены клеточные линии с CasRx-индуцированной системой нокдауна. Наибольшие уровни подавления мРНК целевых генов составили 62% для JUN, 70% для STAT3, 54% для XIAP, 55% для PD-L1.
4. Осуществлён дизайн и сборка рекомбинантной плазмиды, несущей трансген CasRx-T2A-mKate2, а также систему экспрессии коротких РНК под вирусным промотором, для дальнейшего получения рекомбинантного штамма вируса осповакцины.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации.

1. **Dome A**, Dymova M, Richter V, Stepanov G.. Post-transcriptional modifications of RNA as regulators of apoptosis in glioblastoma //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 16. – С. 9272.
2. Vasileva NS, Kuligina EV, Dymova MA, Savinovskaya YI, Zinchenko ND, Ageenko AB, Mishinov SV, **Dome AS**, Stepanov GA, Richter VA, Semenov DV. Transcriptome changes in glioma cells cultivated under conditions of neurosphere formation //Cells. – 2022. – Т. 11. – №. 19. – С. 3106.
3. Semenov DV, Vasileva NS, Dymova MA, Mishinov SV, Savinovskaya YI, Ageenko AB, **Dome AS**, Zinchenko ND, Stepanov GA, Kochneva GV, Richter VA, Kuligina EV. Transcriptome Changes in Glioma Cells upon Infection with the Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact //Cells. – 2023. – Т. 12. – №. 22. – С. 2616.

### Тезисы.

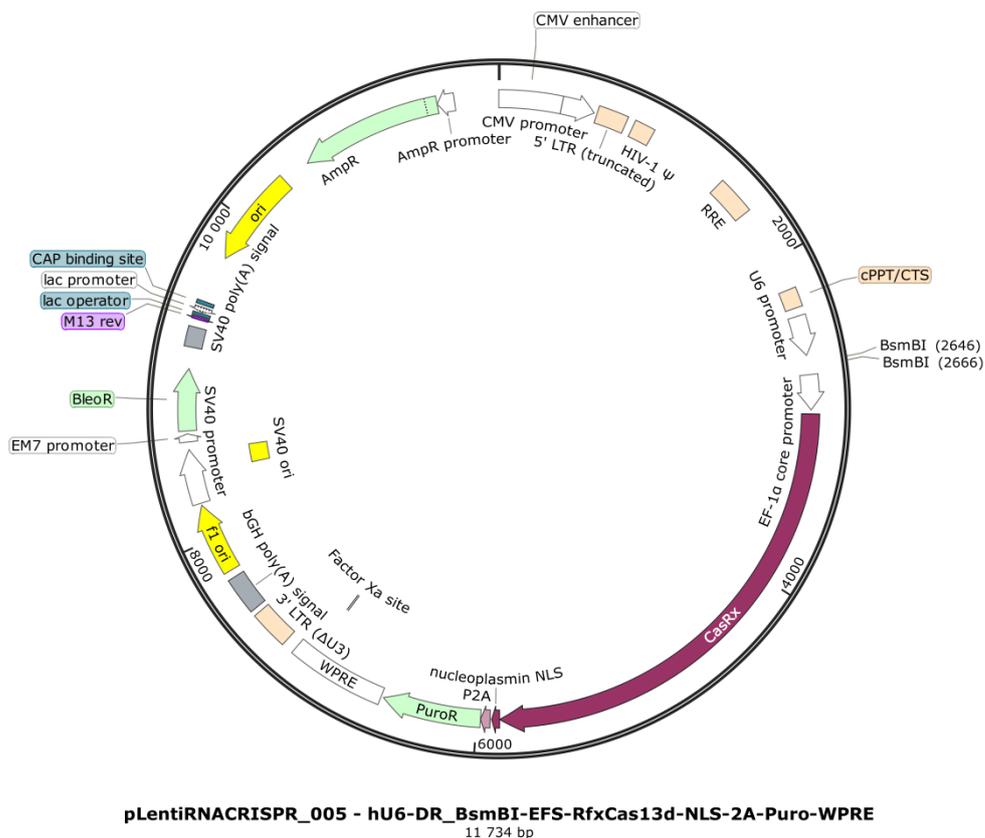
1. **Доме А.С.**, Степанов Г.А., Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А.. Направленная регуляция экспрессии длинных некодирующих рнк и их роль в патогенезе глиобластомы //III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. – 2021. – С. 34-34.
2. **Dome A. S.**, Semenov D. V., Stepanov G. A. GC-05. Long non-coding RNAs as potential targets for genome editing and gene therapy. XV Raisa Gorbacheva Memorial Meeting Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2021. – С. 100-101.
3. **А.С. Доме\***, П.Е. Карицкая, Н.С. Васильева, Г.А. Степанов. Использование системы CRISPR/Cas13d для подавления регулятора апоптоза XIAP в клетках глиобластомы. Материалы международного конгресса CRISPR-2023. – 2023. – С. 66-67.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

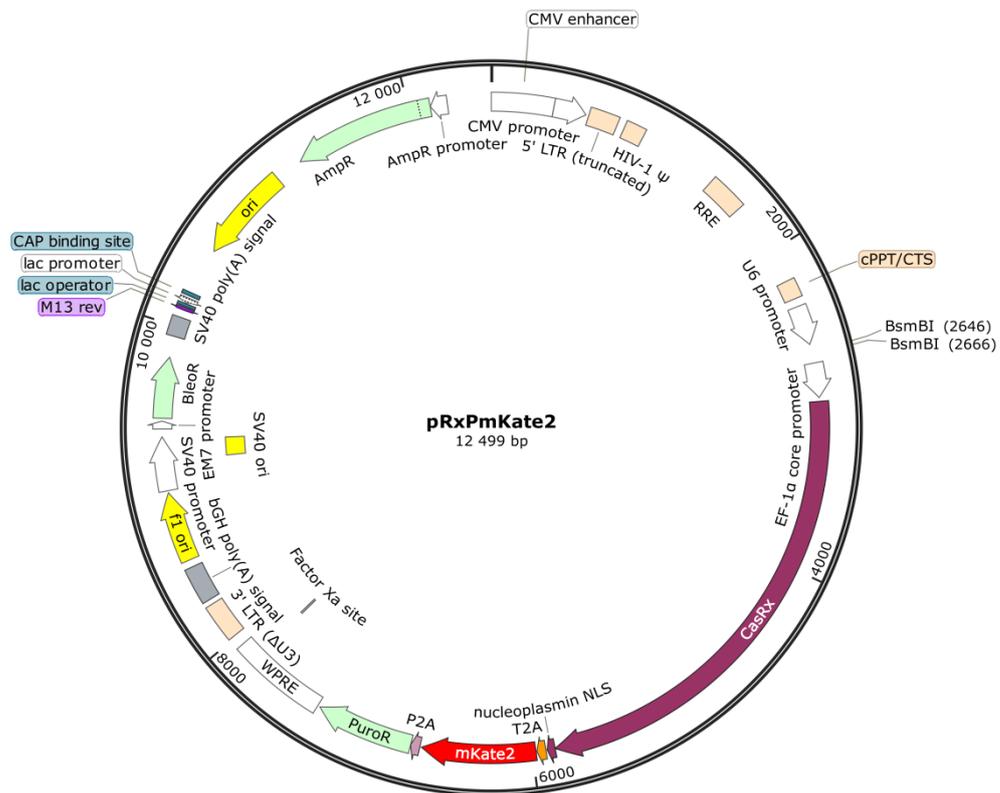
1. Yang M. et al. Immunotherapy for Glioblastoma: Current State, Challenges, and Future Perspectives // *Cancers*. 2020. Vol. 12, № 9. P. 2334.
2. Tan A.C. et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions // *CA. Cancer J. Clin.* 2020. Vol. 70, № 4. P. 299–312.
3. Bommarreddy P.K., Shettigar M., Kaufman H.L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Vol. 18, № 8. P. 498–513.
4. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants | *Nature Reviews Microbiology* [Electronic resource]. URL: <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0299-x> (accessed: 31.01.2024).
5. Abudayyeh O.O. et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13 // *Nature*. 2017. Vol. 550, № 7675. P. 280–284.
6. Wessels H.-H. et al. Prediction of on-target and off-target activity of CRISPR–Cas13d guide RNAs using deep learning // *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2024. Vol. 42, № 4. P. 628–637.
7. Wei J. et al. Deep learning and CRISPR-Cas13d ortholog discovery for optimized RNA targeting // *Cell Syst.* Elsevier, 2023. Vol. 14, № 12. P. 1087-1102.e13.
8. Modeling CRISPR-Cas13d on-target and off-target effects using machine learning approaches | *Nature Communications* [Electronic resource]. URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-36316-3> (accessed: 09.09.2024).
9. Tian S. et al. Primerize: automated primer assembly for transcribing non-coding RNA domains // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43, № W1. P. W522–W526.
10. Oncolytic Virotherapy in Glioma Tumors - PMC [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7589679/> (accessed: 10.09.2024).
11. Immunosuppression in Gliomas via PD-1/PD-L1 Axis and Adenosine Pathway - PMC [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7919594/> (accessed: 10.09.2024).
12. Yi M. et al. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions // *Mol. Cancer*. 2022. Vol. 21, № 1. P. 28.
13. An engineered oncolytic virus expressing PD-L1 inhibitors activates tumor neoantigen-specific T cell responses | *Nature Communications* [Electronic resource]. URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-15229-5> (accessed: 10.09.2024).
14. Tirapelli D.P. da C. et al. High expression of XIAP and Bcl-2 may inhibit programmed cell death in glioblastomas // *Arq. Neuropsiquiatr.* 2017. Vol. 75, № 12. P. 875–880.

15. Wagenknecht B. et al. Expression and biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma // *Cell Death Differ.* 1999. Vol. 6, № 4. P. 370–376.
16. Emery I.F. et al. Expression and function of ABCG2 and XIAP in glioblastomas // *J. Neurooncol.* 2017. Vol. 133, № 1. P. 47–57.
17. Stable XIAP knockdown clones of HCT116 colon cancer cells are more sensitive to TRAIL, taxanes and irradiation in vitro | *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [Electronic resource]. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-008-0872-x> (accessed: 10.09.2024).
18. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) expression level analyzed by immunohistochemistry (IHC) as it relates to clinical and pathologic characteristics in prostate cancer. | *Journal of Clinical Oncology* [Electronic resource]. URL: [https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2023.41.16\\_suppl.e17012](https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.e17012) (accessed: 10.09.2024).
19. Smyth T. et al. Abstract A33: ASTX660, a dual XIAP and cIAP antagonist, potentiates the anti-PD-L1 antibody therapy in mouse tumor models // *Cancer Immunol. Res.* 2017. Vol. 5, № 3\_Supplement. P. A33.
20. Wessels H.-H. et al. Massively parallel Cas13 screens reveal principles for guide RNA design // *Nat. Biotechnol.* 2020. Vol. 38, № 6. P. 722–727.
21. Liu Z. et al. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 2193.
22. Kumar M. et al. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors // *Hum. Gene Ther.* 2001. Vol. 12, № 15. P. 1893–1905.
23. Burris B.J.D. et al. Optimization of specific RNA knockdown in mammalian cells with CRISPR-Cas13 // *Methods San Diego Calif.* 2022. Vol. 206. P. 58–68.

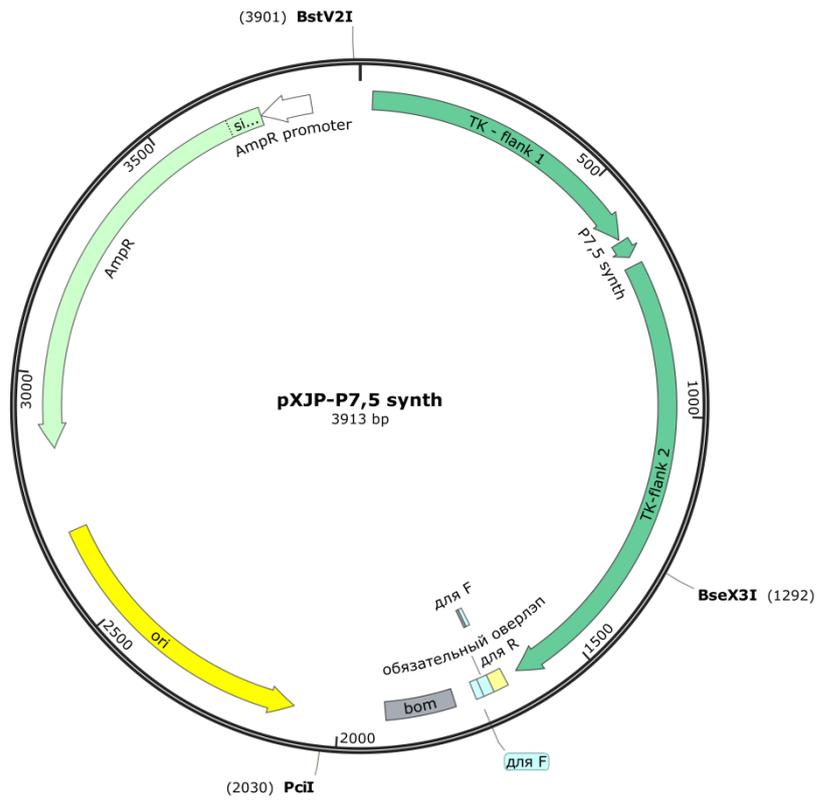
## Приложение



**Рисунок П1.** Карта плазмиды pRxP. BsmBI – сайт для встраивания направляющей РНК, CasRx – ген, кодирующий белок CasRx, PuroR – ген пурамицин-N-ацетилтрансферазы, AmpR – ген β-галактозидазы.



**Рисунок П2.** Карта плазмиды pRxP-mKate2. BsmBI – сайт для встраивания направляющей РНК, CasRx – ген, кодирующий белок CasRx, mKate2 – ген, кодирующий флуоресцентный белок mKate2, PuroR – ген пурамицин-N-ацетилтрансферазы, AmpR – ген β-галактозидазы.



**Рисунок ПЗ.** Карта плазмиды pXJP-P7.5 synth. TK-flank 1 и TR-flank 2 – фрагменты гена тимидинкиназы вируса осповакцины, AmpR – ген  $\beta$ -галактозидазы, PciI и BseX3I – сайты рестрикции, по которым проводилось клонирование для создания плазмиды pXJPmod.

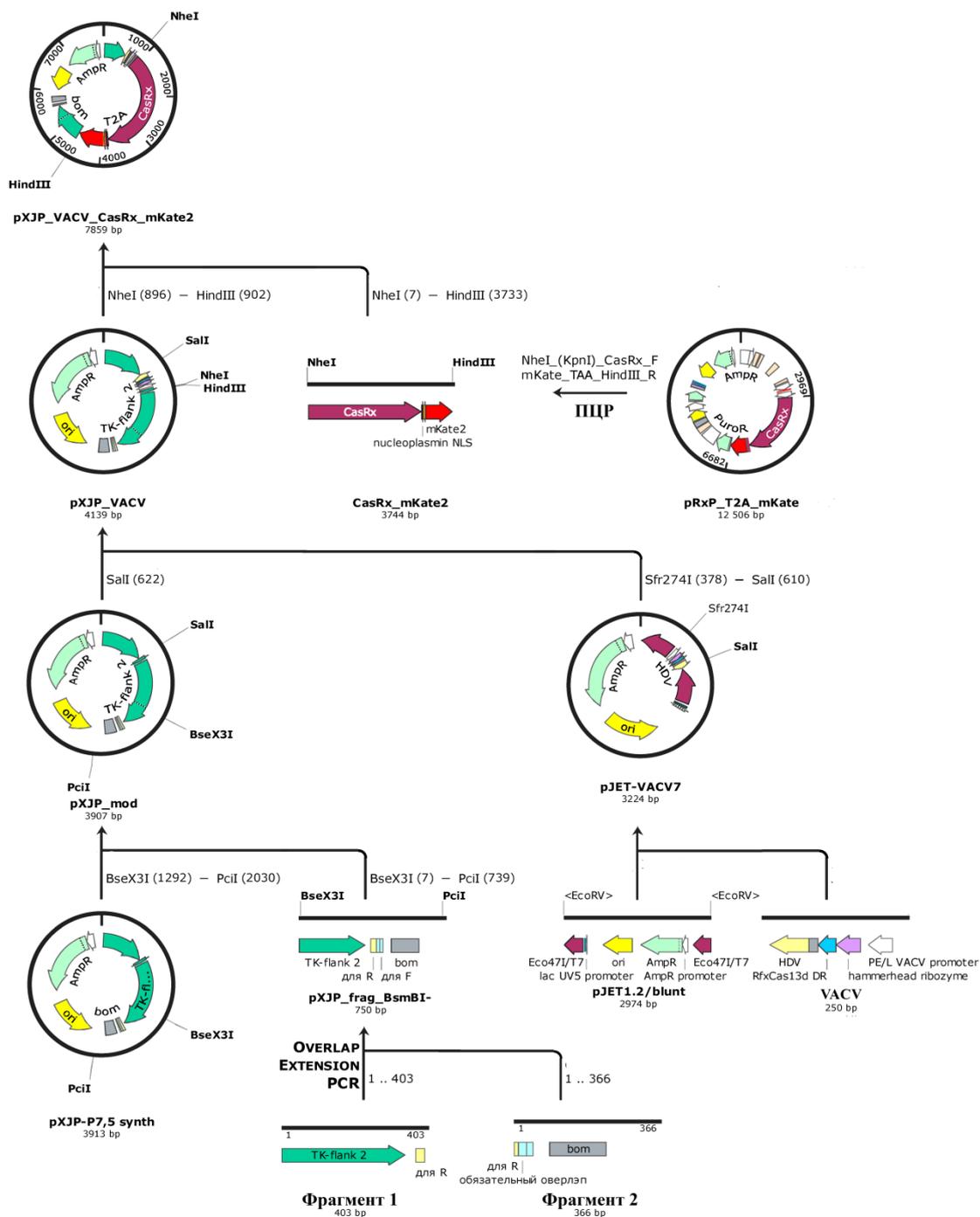
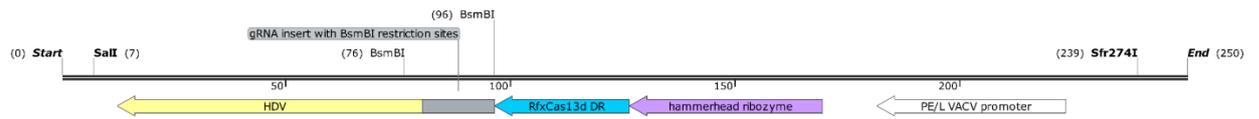


Рисунок П4. Схема клонирования плазмиды pXJP\_VACV\_CasRx\_mKate2.



**Рисунок П5.** Карта синтетического фрагмента VACV. HDV – рибозим типа Hepatitis Delta Virus, BsmBI – сайт рестрикции для встраивания направляющей РНК, RfxCas13dDR – прямой повтор направляющей РНК, hammerhead ribozyme – рибозим типа hammerhead, PE/L VACV promoter – промотор вируса осповакцины

**Олигодезоксирибонуклеотиды, использовавшиеся в работе**

<b>ОДН</b>	<b>Последовательность</b>
sgSTAT3_1F	5'- AAACTCCATCCTGTGGTACAACATGCTGACCAAC - 3'
sgSTAT3_1R	5'- AAAAGTTGGTCAGCATGTTGTACCACAGGATGGA - 3'
sgSTAT3_2F	5'- AAACCAGCTACAGCAGCTTGACACACG - 3'
sgSTAT3_2R	5'- AAAACGTGTGTCAAGCTGCTGTAGCTG - 3'
sgSTAT3_3F	5'- AAACACGACCTGCAGCAATACCATTGA - 3'
sgSTAT3_3R	5'- AAAATCAATGGTATTGCTGCAGGTCGT - 3'
qSTAT3_F	5'- CAAGGGCTTCTCCTTCTGGG - 3'
qSTAT3_R	5'- GGATCTGGGTCTTACCGCTG - 3'
sgJUN_1F	5'- AAACGCTGTGCCACCTGTTCCCTGAGC - 3'
sgJUN_1R	5'- AAAAGCTCAGGGAACAGGTGGCACAGC - 3'
sgJUN_2F	5'- AAACGTTGCTGAGGTTTGCCTAGACCGGCGGCTC - 3'
sgJUN_2R	5'- AAAAGAGCCGCCGGTCTACGCAAACCTCAGCAAC - 3'
sgJUN_3F	5'- AAACGTTACTGTAGCCATAAGGTCCGC - 3'
sgJUN_3R	5'- AAAAGCGGACCTTATGGCTACAGTAAC - 3'
qJUN_F	5'- GTGCCGAAAAAGGAAGCTGG - 3'
qJUN_R	5'- CTGCGTTAGCATGAGTTGGC - 3'
hU6_F	5'- GAGGGCCTATTTCCCATGATT - 3'
EF1 $\alpha$ _R	5'- TTCTCTAGGCACCGGATCAA - 3'
qGAPDH_F	5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC - 3'
qGAPDH_R	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGT - 3'
qALB_F	5'- TTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGA - 3'
qALB_R	5'- TGGGGAGGCTATAGAAAATAAGG - 3'
qWPRE_F	5'- GTCCTTTCCTTGGCTGCTC - 3'
qWPRE_R	5'- CCGAAGGGACGTAGCAGA - 3'
gPD29_F	5'- AAACGACCTACTGGCATTGCTGAACG - 3'
gPD29_R	5'- AAAACGTTTCAGCAAATGCCAGTAGGTC - 3'
gPD150_F	5'- AAACGCTGCACTAATTGTCTATTGGGA - 3'
gPD150_R	5'- AAAATCCCAATAGACAATTAGTGCAGC - 3'
gPD393_F	5'- AAACGCCCCATACAACAAAATCAACCA - 3'

gPD393_R	5'- AAAATGGTTGATTTTGTGTATGGGGC -3'
pXJP_1F	5'- AATTGACGGCCGCCATCATG -3'
pXJP_1R	5'- AAGCTGTGACCGGGAGCTGCATGTG -3'
pXJP_2F	5'- CAGCTCCCGGTCACAGCTTGTCTGTAAGC -3'
pXJP_2R	5'- TTGCTCACATGTTCTTTCTGCGT -3'
pJET1.2 forward sequencing primer	5'- CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC -3'
pJET1.2 reverse sequencing primer	5'- AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG -3'
qPD-L1_F	5'- AAATTGCAGGATGCAGGGGT -3'
qPD-L1_R	5'- TTGGAATTGGTGGTGGTGGT -3'
Primer1	5'- TAAGCAGTCGACGTCCCATTCGCCATGCCGAAGCATGTTGCC CAGCCGGCGCCAGCG -3'
Primer2	5'- GAAACGGAGACGGACGTCTCTGGCCGGCATGGTCCCAGCCTC CTCGCTGGCGCCGGCT -3'
Primer3	5'- CGTCCGTCTCCGTTTCAAACCCCGACCAGTTGGTAGGGGTTG ACGAGCTTACTCGTTTCG -3'
Primer4	5'- ACGTACGGCATGCGGGGTTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAA ACGAGTAAGCTCGTCA -3'
Primer5	5'- CGCATGCCGTACGTTTATATTCCAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAATT TCAATTTTTGGCCGGCGG -3'
Primer6	5'- TAAGCACTCGAGTGATCCGCCTCCGCCGGCCAAAAATTG - 3'





# Отчет о проверке

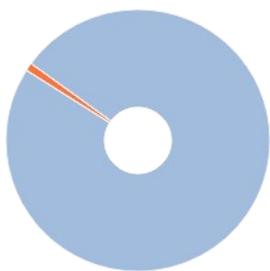
Автор: Дюма Антон Сергеевич

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: AD\_St\_Научный\_доклад\_ДюмаАС\_wr

## РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

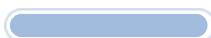
Тариф: FULL



Совпадения:  
1,36%



Оригинальность:  
98,64%



Цитирования:  
0%



Самоцитирования:  
0%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

- Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

## ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 25

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 10.09.2024 14:14:08

Дата корректировки: 10.09.2024 14:20:32

Количество страниц: 29

Символов в тексте: 32946

Слов в тексте: 4238

Число предложений: 377

Комментарий: не указано

## ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Да

Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

**Модули поиска:** Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Шаблонные фразы, Цитирование, Переводные заимствования (KyEn), СМИ России и СНГ, Библиография, Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования IEEE, Переводные заимствования\*, Публикации РГБ, Диссертации НББ, Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Перефразирования по Интернету (EN), Переводные заимствования (RuEn), Кольцо вузов, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, ИПС Адилет, Коллекция НБУ, СПС ГАРАНТ: аналитика, Публикации eLIBRARY, Перефразирования по коллекции IEEE, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, IEEE, Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Патенты СССР, РФ, СНГ, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Медицина, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Перефразирования по Интернету, Сводная коллекция ЭБС, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Интернет Плюс\*, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Публикации РГБ (переводы и перефразирования)

🚫 Модули, недоступные в рамках тарифа: Интернет Free

## ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	18,41%	0%	Диплом МВ_второй вариант	19 Мая 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	16,85%	0%	Диплом МВ_второй вариант	19 Мая 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[03]	14,89%	0%	диплом_Карицкая_Полина_Евген...	17 Мая 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	14,56%	0%	диплом_Карицкая_Полина_Евген...	17 Мая 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	1,93%	0%	%D0%A1%D0%B1%D0%BE%D1%8... <a href="http://almazovcentre.ru">http://almazovcentre.ru</a>	04 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	1,56%	0%	Савин, Иннокентий Андреевич ... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2023	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	1,36%	1,36%	МАТЕРИАЛЫ VIII МОЛОДЕЖНОЙ ... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	01 Янв 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[08]	1,03%	0%	Экспериментальные исследован...	06 Окт 2020	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	0,98%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	19 Июл 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[10]	0,97%	0%	БИОСHEM_Vol203022022.pdf <a href="http://rusbiochem.org">http://rusbiochem.org</a>	23 Дек 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[11]	0,97%	0%	<a href="https://kpfu.ru/staff_files/F_16355...">https://kpfu.ru/staff_files/F_16355...</a> <a href="https://kpfu.ru">https://kpfu.ru</a>	27 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[12]	0,97%	0%	БИОСHEM_Vol210122021.pdf <a href="https://pureportal.spbu.ru">https://pureportal.spbu.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[13]	0,97%	0%	<a href="https://kpfu.ru/staff_files/F_16355...">https://kpfu.ru/staff_files/F_16355...</a> <a href="https://kpfu.ru">https://kpfu.ru</a>	12 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[14]	0,66%	0%	<a href="http://cttjournal.com/upload/ibloc...">http://cttjournal.com/upload/ibloc...</a> <a href="http://cttjournal.com">http://cttjournal.com</a>	06 Сен 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[15]	0,66%	0%	<a href="http://www.cttjournal.com/upload...">http://www.cttjournal.com/upload...</a> <a href="http://cttjournal.com">http://cttjournal.com</a>	24 Янв 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	0,56%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[17]	0,54%	0%	Особенности распределения ди... <a href="http://earthpapers.net">http://earthpapers.net</a>	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,54%	0%	Зотова (Шунаева), Анастасия Анд... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2019	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,53%	0%	1694145430663_2023.Vol_XVIII_A... <a href="https://conf.icgbio.ru">https://conf.icgbio.ru</a>	12 Июл 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[20]	0,53%	0%	Павлюков, Марат Самвелович Ро... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2019	русском сегменте Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[21]	0,49%	0%	<a href="http://cttjournal.com/upload/ibloc...">http://cttjournal.com/upload/ibloc...</a> <a href="http://cttjournal.com">http://cttjournal.com</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	0,47%	0%	<a href="https://pure.spbu.ru/ws/portalfile...">https://pure.spbu.ru/ws/portalfile...</a> <a href="https://pure.spbu.ru">https://pure.spbu.ru</a>	16 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	0,47%	0%	<a href="http://rusbiochem.org/files/uploa...">http://rusbiochem.org/files/uploa...</a> <a href="http://rusbiochem.org">http://rusbiochem.org</a>	23 Окт 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	0,46%	0%	Троицкая, Ольга Сергеевна Иссл... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	14 Ноя 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,46%	0%	sbornik-tezisev.pdf <a href="https://iai.msu.ru">https://iai.msu.ru</a>	04 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,46%	0%	<a href="https://genescells.ru/files/journal...">https://genescells.ru/files/journal...</a> <a href="https://genescells.ru">https://genescells.ru</a>	06 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,46%	0%	<a href="https://conf.icgbio.ru/crispr2023/...">https://conf.icgbio.ru/crispr2023/...</a> <a href="https://conf.icgbio.ru">https://conf.icgbio.ru</a>	23 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,46%	0%	<a href="https://conf.icgbio.ru/crispr2023/...">https://conf.icgbio.ru/crispr2023/...</a> <a href="https://conf.icgbio.ru">https://conf.icgbio.ru</a>	17 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,45%	0%	Жильникова_ДИПЛОМ	21 Мая 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,36%	0%	Определение нормативных зна... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	28 Мая 2018	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,35%	0%	Т. 2   part#2 <a href="http://emll.ru">http://emll.ru</a>	08 Июл 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,33%	0%	Диплом_без списка литературы	19 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,32%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,31%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	26 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,29%	0%	<a href="http://www.almazovcentre.ru/wp-...">http://www.almazovcentre.ru/wp-...</a> <a href="http://almazovcentre.ru">http://almazovcentre.ru</a>	19 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,27%	0%	<a href="http://www.youngbio-conf.unn.ru/...">http://www.youngbio-conf.unn.ru/...</a> <a href="http://youngbio-conf.unn.ru">http://youngbio-conf.unn.ru</a>	31 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,24%	0%	<a href="https://new-disser.ru/_avtoreferat...">https://new-disser.ru/_avtoreferat...</a> <a href="https://new-disser.ru">https://new-disser.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,23%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	26 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,22%	0%	<a href="http://www.cttjournal.com/upload...">http://www.cttjournal.com/upload...</a> <a href="http://cttjournal.com">http://cttjournal.com</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,21%	0%	<a href="https://istina.msu.ru/download/41...">https://istina.msu.ru/download/41...</a> <a href="https://istina.msu.ru">https://istina.msu.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,18%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	19 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,16%	0%	Научные публикации ФБУН ГНЦ ... <a href="http://vector.nsc.ru">http://vector.nsc.ru</a>	23 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,08%	0%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на  
объём заимствования

Доме Антон Сергеевич

«Разработка стратегий подавления экспрессии опухоль-ассоциированных  
генов с использованием систем геномного редактирования»

Оригинальность работы составляет 98.64%, что соответствует требованиям  
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на  
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко