



УДК 577.1+612.015

# ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *Stk11* В ЛИНИИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО МЫШИ LLC1 НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РАДИОТЕРАПИИ ЧАСТИЦАМИ

© 2025 г. Е. А. Ганцова\*, \*\*, #, И. В. Арутюнян\*, \*\*, А. Г. Соболева\*, \*\*, К. М. Шакирова\*, \*\*, Е. Ю. Кананыхина\*\*, Д. В. Бальчир\*, П. А. Вишнякова\*, В. О. Сабуров\*\*\*\*, К. Б. Гордон\*, \*\*\*\*, Т. Х. Фатхудинов\*, \*\*

\* НИИ молекулярной и клеточной медицины ФГАОУ ВО “Российский университет дружбы народов им. Патрика Лумумбы”,

Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

\*\* Научно-исследовательский институт морфологии человека им. А.В. Авцына ФГБНУ “Национальный исследовательский центр хирургии им. акад. П.Г. Петровского”,

Россия, 117418 Москва, ул. Цюрупы, 3

\*\*\* Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

\*\*\*\* Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыбы – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России,

Россия, 249036 Обнинск, ул. Королева, 4

Поступила в редакцию 14.05.2025 г.

После доработки 26.05.2025 г.

Принята к публикации 27.05.2025 г.

Аденокарцинома легкого – это злокачественная опухоль, наиболее распространенная разновидность немелкоклеточного рака легких. Низкая эффективность стандартных методов лечения аденокарциномы легкого с мутацией гена-онкосупрессора *Stk11* представляет серьезную проблему в клинической практике. Поиск и совершенствование новых терапевтических подходов для данного заболевания остается актуальной задачей современной биомедицины. Цель работы – создание модели рака легкого *in vitro* на основе клеточной линии LLC1 с нокаутом гена *Stk11* для оценки чувствительности мутантных клеток к различным видам лучевой терапии, включая облучение фотонами, протонами и нейтронами. В качестве основных методов использовали технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 для получения мутантных клонов, лазерную сортировку клеток, ПЦР-анализ для подтверждения делеции, а также оценку жизнеспособности, пролиферации (метаболические тесты, экспрессия маркера *Mki67*), индукции апоптоза (метод аннексин V-PI) и экспрессии гена *Pten* после облучения клеток дозой 2 Гр. В результате были получены гетерозиготные мутантные линии LLC1-STK11-Mut. Облучение клеток выявило, что у мутантных по *Stk11* клеток радиоиндуцированная стимуляция роста сохранялась дольше, чем у клеток дикого типа, а также наблюдалось значительное увеличение доли поздних апоптотических и некротических клеток. При этом экспрессия *Mki67* временно снижалась после облучения, но быстро восстанавливалась у мутантных клеток, что свидетельствует об их более высокой радиорезистентности. В отличие от клеток дикого типа, у мутантных клеток уровень экспрессии гена *Pten* после облучения существенно не изменился. Таким образом, мутация *Stk11* способствует формированию радиорезистентности опухолевых клеток за счет запуска различных адаптационных механизмов. Полученная *in vitro* модель может использоваться для дальнейшего изучения радиорезистентности и разработки новых подходов к терапии опухолей с мутацией *STK11*.

**Ключевые слова:** аденокарцинома легкого, серин/треониновая киназа 11 (STK11), адронная терапия, терапия частицами, иммунотерапия рака

**DOI:** 10.31857/S0132342325050204

Сокращения: eGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок; FITC – флуоресцеин; LKB1 – печеночная киназа 1; LLC1 – легочная карцинома Льюиса; PCSK9 – пропротеиновая конвертаза субтилизин/кексин тип 9; PI – пропидия иодид; sgРНК – одночная направляющая РНК; STK11 – серин/треониновая киназа 11; ЛТ – лучевая терапия; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 433-27-94; эл. почта: gantsova\_ea@rudn.ru).

## ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого – один из самых распространенных видов злокачественных опухолей, ежегодно уносящий жизни почти двух миллионов людей в мире [1]. В настоящее время общая 5-летняя выживаемость пациентов с adenокарциномой легкого, наиболее распространенной разновидностью немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), составляет <20% [2,3]. Аденокарцинома легкого с мутацией гена-онкосупрессора *Stk11* встречается почти в 30% случаев; такая опухоль устойчива к лучевой терапии, химио- и иммунотерапии, что определяет прогноз лечения как крайне неблагоприятный [4]. Ген *Stk11* кодирует печеночную киназу B1 (STK11/LKB1), высококонсервативную серин/ треониновую киназу, которая играет важную роль в различных клеточных процессах, связанных с энергетическим обменом [5]. Для данного фермента подробно описана функция подавления опухолевого роста путем активации AMPK-связанных киназ, важнейших регуляторов выживания клеток в стрессовых условиях [6]. В доклинических моделях потеря STK11/LKB1 была связана с прогрессированием рака легкого и развитием метастазов. Кроме того, как доклинические, так и клинические данные указывают на то, что инактивация STK11/LKB1 коррелирует с подавлением иммунного микроокружения опухоли, характеризующимся сниженным количеством инфильтрирующих цитотоксических CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, более низкой экспрессией PD-(L)1 и привлечением нейтрофилов в опухолевое микроокружение [7]. Таким образом, разработка новых комплексных стратегий лечения данного типа adenокарциномы легкого имеет важное клиническое значение [8].

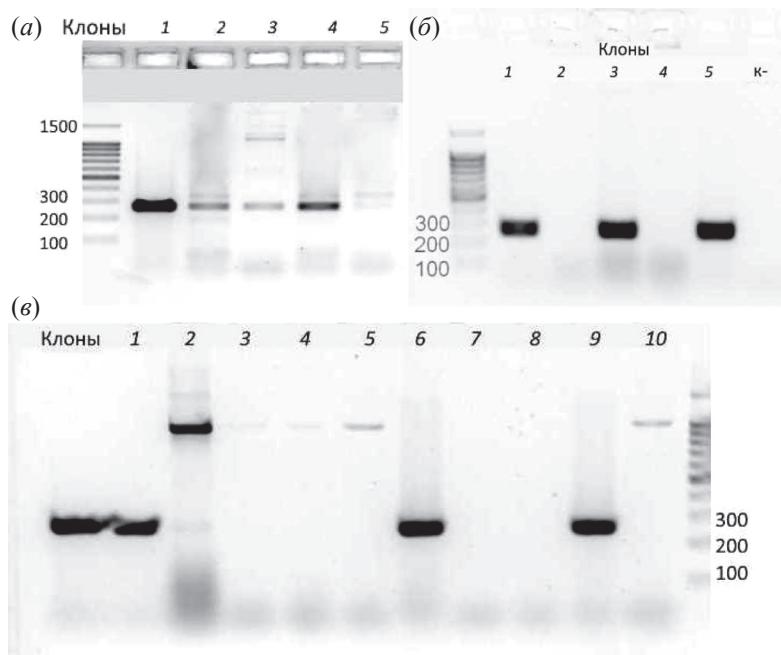
Лучевая терапия (ЛТ) – один из ведущих методов лечения злокачественных опухолей [9]. В настоящее время у пациентов, в том числе больных раком легкого, в подавляющем большинстве случаев применяется стандартная фотонная терапия [10], однако облучение частицами – протонами, нейtronами, ионами углерода – имеет ряд преимуществ при данной нозологии. Так, использование протонной терапии при ранней стадии НМРЛ повысило 3-летнюю безрецидивную выживаемость до 80% в нескольких исследованиях [11]. При местно-распространенном НМРЛ, который характеризуется высокой смертностью и устойчивостью к терапии, облучение протонами привело к

более низким показателям легочной, пищеводной и гематологической токсичности, чем облучение фотонами [12]. Терапия быстрыми нейtronами имеет лучшие показатели локального контроля и общей выживаемости при распространенном НМРЛ по сравнению с традиционной терапией [13]. ЛТ с высокой линейной передачей энергии, представленная нейtronами и ионами углерода, оказывает множество различных биологических воздействий на опухолевые ткани по сравнению с традиционной ЛТ [14], закладывая хорошую основу для более эффективных вариантов комбинированного лечения с другими противоопухолевыми методами лечения, особенно для adenокарциномы легкого с мутацией *Stk11*, которая может быть потенциально устойчива к традиционной фотонной радиотерапии. Очевидно, что сравнение эффектов различных режимов противоопухолевой терапии и разработка новых экспериментальных подходов требует использования релевантных моделей. На доклиническом этапе исследований самыми распространенными моделями служат клеточные линии, в том числе линия adenокарциномы легкого мыши LLC1 [15].

Целью настоящего исследования стало получение модели рака легкого *in vitro* на основе клеток линии LLC1, несущих мутантную форму гена *Stk11*, для оценки их чувствительности к терапии частицами, в частности протонами и нейtronами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания нокаутирующей ген делеции использовали систему геномного редактирования CRISPR/Cas9. Подтверждение успешного лигирования олигонуклеотидов, кодирующих одиночные направляющие РНК (sgРНК) в вектор, проводили при помощи ПЦР с прямым праймером, специфичным к последовательности sgРНК, и обратным, специфичным к последовательности вектора M13Rv–AGCGGATAACAATTTCACACAGGA, результаты скрининга собранных векторов представлены на рис. 1. Для каждой sgРНК были получены бактериальные клони *Escherichia coli*, содержащие плазмиды с целевыми вставками: sgРНК 213 (рис. 1 $\alpha$ ), sgРНК 266 (рис. 1 $\beta$ ) и sgРНК 365 (рис. 1 $\gamma$ ). Из колоний, содержащих вставки, наращивали бактериальные культуры и выделяли плазмидную ДНК. Все три компонента системы, пару sgРНК и последовательность, кодирующую белок Cas9, доставляли в клетки единовременно в

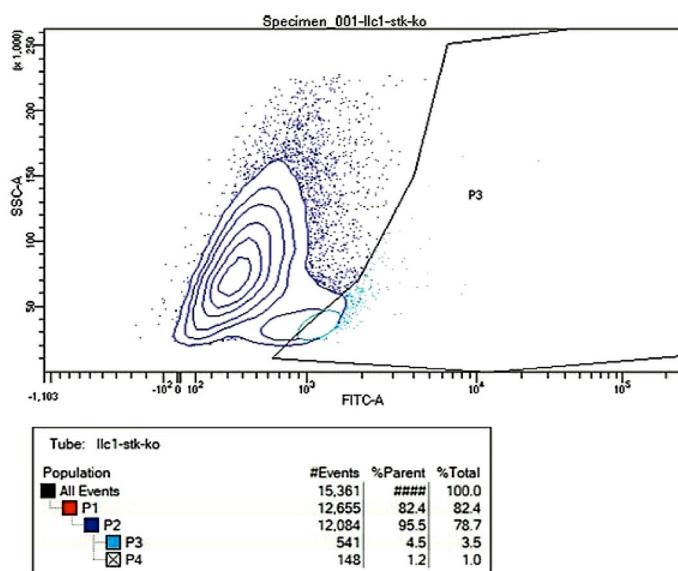


**Рис. 1.** Анализ клонов *E. coli* после лигирования олигонуклеотидов, кодирующих sgPHK 213 (a), sgPHK 266 (b) и sgPHK 365 (c), в вектор pU6-sgRNA.

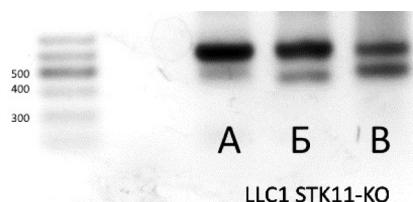
составе плазмид pU6-sgRNA и pCas9-IRES-eGFP соответственно с помощью электропорации.

В качестве репортерного гена использовали ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок eGFP, отделяли положительную популяцию методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией на приборе BD FACSAria III в канале FITC, в результате электропорации

положительные по eGFP клетки составляли ~3%; популяция клеток, выбранных для лазерной сортировки, представлена на рис. 2. Клетки, несущие мутацию *Stk11*, детектировали методом ПЦР, результаты трех наборов гетерозиготных мутантов представлены на рис. 3. Для линии LLC1 определена делеция в пуле клеток после лазерной сортировки: LLC1 STK11-KO-213-365



**Рис. 2.** Диаграмма плотности и гейт популяции P3 – eGFP<sup>+</sup>-клеток LLC1, отсортированных с помощью FACS, а также таблица иерархии гейтов, где P1 – все события, P2 – единичные клетки, P4 – клетки, окрашенные 7-AAD.



**Рис. 3.** Детекция продуктов нокаяута гена *Stk11* в линии мыши LLC1, электропорированных сочетанием sgPHK 213-365 и 266-365.

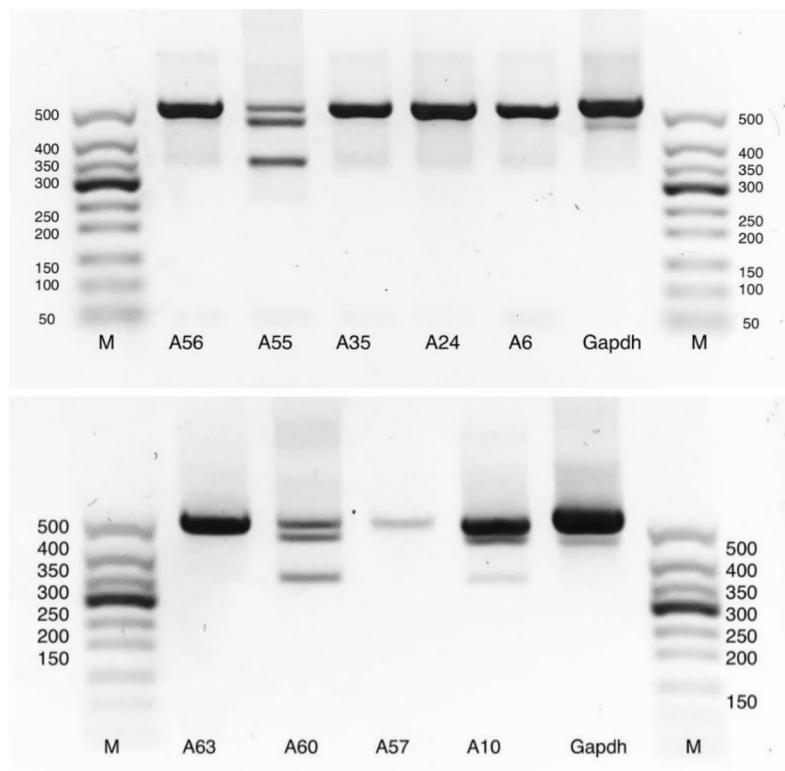
(номера соответствуют sgPHK, использованным для создания делеции) и LLC1 STK11-KO-266-365, которые обозначали как LLC1 А, LLC1 Б и LLC1 В соответственно. Во всех повторах обнаружены клетки, несущие делецию, и для дальнейшей работы пытались получить мутантные гомозиготы.

Для выделения клонов отдельных клеток сортированные клетки подвергали предельному разбавлению и вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве 50 клеток на планшет. Клоны-потомки одной клетки далее анализировали методом ПЦР с праймерами для последовательности mSTK11 с целью выявления клонов, несущих делеции в целевом гене. Визуализацию результатов ПЦР-

амплификации проводили при помощи разделения полученных ПЦР-продуктов в 1%-ном агарозном геле (рис. 4). Большинство отобранных клонов не содержали модифицированную последовательность – об этом можно судить по наличию одного продукта амплификации на геле в районе 508 п.н., аналогично исходным клеткам. Низкое содержание клеток, несущих модифицированную последовательность, возможно, объясняется снижением жизнеспособности трансформированных клеток.

Для дальнейшей работы отобрали гетерозиготные клоны A55 и A60, которые по результатам ПЦР-анализа несут модифицированный вариант последовательности *Stk11*. С помощью световой фазово-контрастной микроскопии показано, что морфологически мутантная линия LLC1-STK11-Mut (рис. 5а) не отличалась от линии дикого типа LLC1 (рис. 5б). На данных фотографиях можно наблюдать, что подавление экспрессии *Stk11* не привело к изменению характеристик клеток: формы клеток, выраженности адгезии к культуральной подложке, скорости роста.

Облучение клеточных культур, несущих мутацию в гене *Stk11*, с помощью терапии частицами



**Рис. 4.** Анализ клонов гетерозиготной мутантной линии LLC1-А, разделение продуктов амплификации в 1%-ном агарозном геле. Маркер молекулярных весов GelPilot 50 bp (Qiagen, Германия).

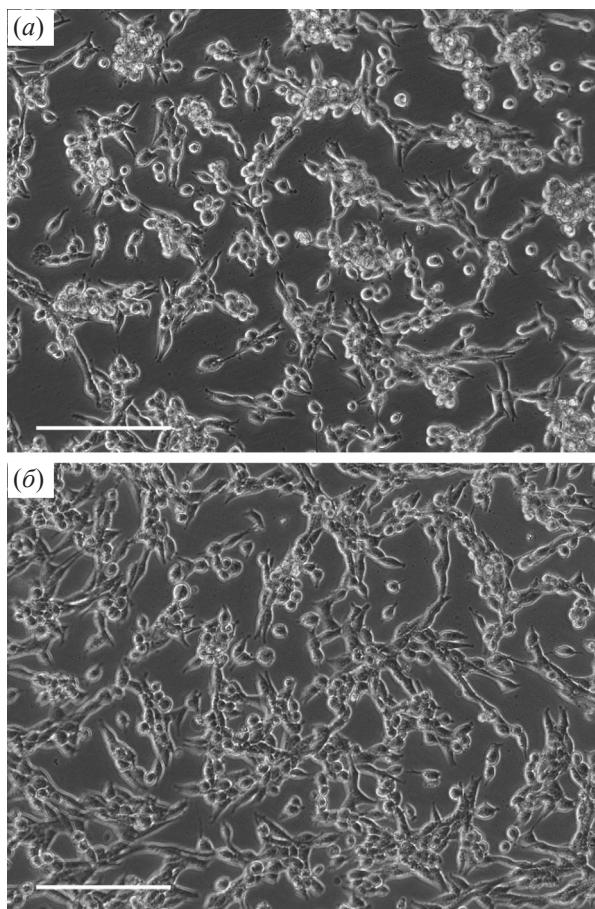


Рис. 5. Клеточные линии adenокарциномы легкого мыши: (а) – LLC1-STK11-Mut; (б) – LLC1. Фазовый контраст, масштабный отрезок – 200 мкм.

проводили на базе Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба в г. Обнинск. Для облучения фотонами, протонами и нейтронами была выбрана стандартная доза 2 Гр, которая обычно используется для пациентов в качестве однократной дозы (фракции), а также применяется в других исследованиях на клеточных линиях [13, 16].

Через 4 ч после облучения жизнеспособность клеток, определяемая с помощью автоматического счетчика клеток, оставалась высокой (не менее 95%), что подтверждает данные об отложенном во времени эффекте облучения частицами [17].

Через 1 сутки после воздействия мы наблюдали неожиданный эффект: суммарная метаболическая активность клеток LLC1 дикого типа возрастила после облучения независимо от типа источника, а для клеток LLC1-STK11-Mut показатели метаболического теста возрастили только

в группе облучения протонами (рис. 6а). Можно предположить, что эффект был вызван адаптивным ответом опухолевых клеток на радиоиндуцированный стресс: показано, что однократные невысокие дозы облучения 0.5–2 Гр могут стимулировать пролиферацию опухолевых клеток [18].

Через 3 суток после воздействия показатели метаболического теста выросли как для клеток LLC1 дикого типа, так и для мутантного по гену *Stk11* клона, что говорит о сохранности пула активно пролиферирующих клеток после облучения в дозе 2 Гр и характеризует линию LLC1 как радиоустойчивую. Для исходной линии LLC1 наблюдали значимое снижение показателя жизнеспособности в группе облученных нейтронами клеток (рис. 6б), что вполне ожидаемо, поскольку нейтроны обладают большей энергией проникновения и вызывают большие повреждения ДНК, а следовательно, и гибель клеток [19]. Клетки линии с мутацией в гене *Stk11* на 3 сутки сохраняли эффект радиоиндуцированной стимуляции пролиферации после облучения частицами, что может быть связано с запуском механизмов reparации поврежденной ДНК и объясняет развитие радиорезистентности опухолевых клеток, несущих подобную мутацию. Для мышей ген *Stk11* связывают с процессом образования опухолей [20], инактивация часто мутирующего гена-супрессора опухолей *Stk11* оказывает воздействие на протяжении всего прогрессирования рака легкого, что приводит к эпигенетическому перепрограммированию первичных опухолей [21].

Нами была проведена оценка запуска апоптоза в клеточных линиях через 1 сутки после облучения с помощью проточной цитометрии, с окрашиванием клеток красителями аннексин V-FITC и пропидием йода (PI). На рис. 7 видно, что доля некротических клеток и клеток, вступивших в поздний апоптоз, увеличивается у всех групп линии LLC1-STK11-Mut.

При оценке апоптоза мы обнаружили у мутантных клеток значительный прирост доли поздних апоптотических/некротических клеток, что указывает на развитие необратимой клеточной гибели. Вероятно, данный эффект связан с тем, что мутантные клетки более чувствительны к внешним воздействиям и активнее запускают механизм программируемой клеточной гибели, т.к. нам не удалось получить гомозиготный клон клеток LLC1, несущий делецию в гене *Stk11*. Такое рас-

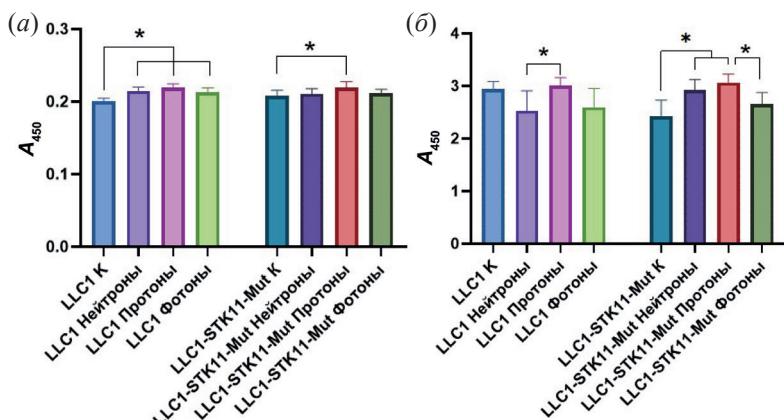


Рис. 6. Оценка жизнеспособности клеток LLC1 после терапии частицами через 1 сутки (а) и 3 суток (б) после облучения. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение. \*  $p < 0.05$ .

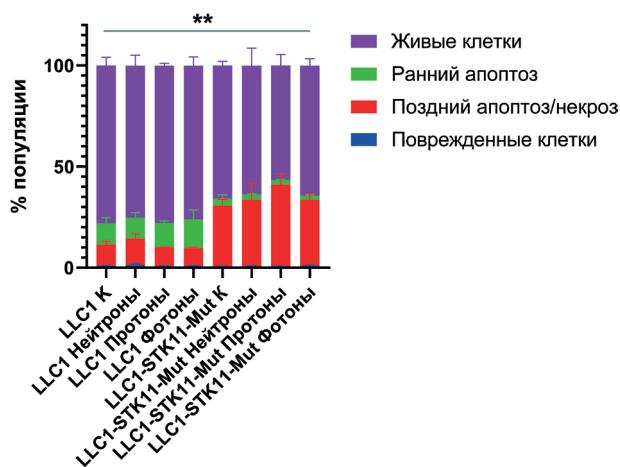


Рис. 7. Оценка некроза и апоптоза клеток LLC1 спустя 1 сутки после облучения методом проточной цитометрии с помощью теста аннексин V-FITC и пропидия йодид (PI), процент от общей популяции клеток, двухфакторный дисперсионный анализ \*\*  $p < 0.01$ , множественное сравнение – тест Тьюки.

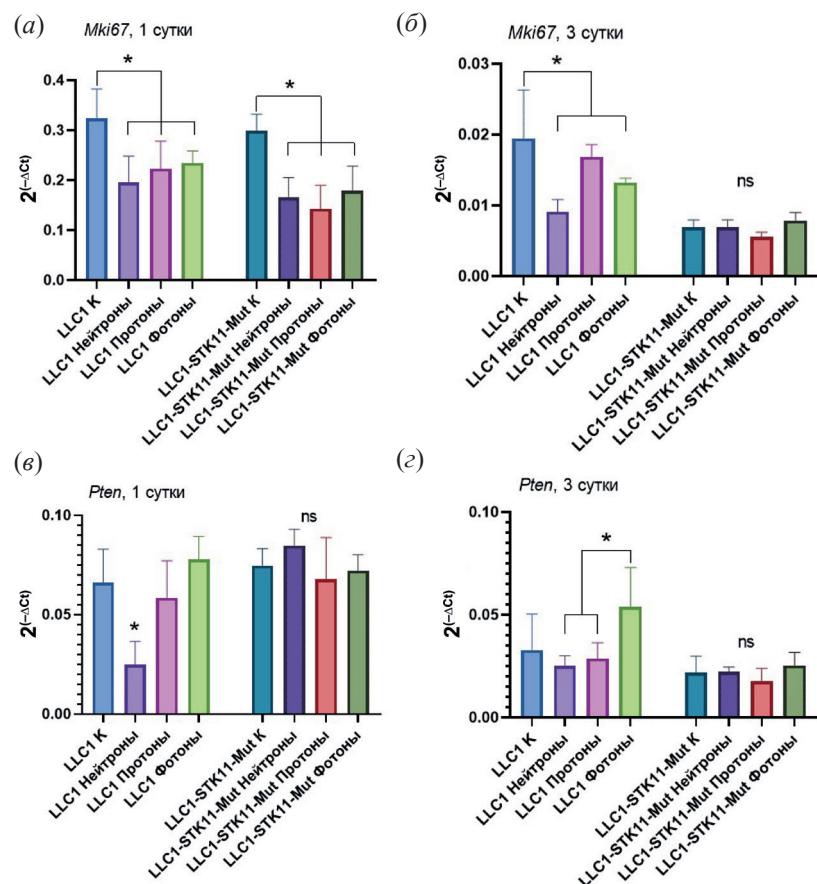
пределение может также влиять на показатели так называемого “опухолевого равновесия” (в англоязычной литературе “tumor equilibrium”), баланса между пролиферацией и гибелью клеток: увеличение доли гибнущих клеток должно быть компенсировано более активным делением сохранившего пул клеток.

С помощью ПЦР в реальном времени мы оценили экспрессию генов *Mki67* и *Pten*, часто используемых для характеристики опухолей. Ген *Mki67* кодирует ядерный белок Ki-67, который уже несколько десятилетий считается маркером пролиферации клеток [22] и часто используется

при оценке опухолевого роста после терапии [23, 24]. Через 1 сутки после облучения (рис. 8а, 8б) в обеих линиях рака легкого наблюдалось снижение экспрессии гена *Mki67*, выполняющего роль регулятора канцерогенеза в целом [25, 26]. Снижение экспрессии маркера Ki-67 характерно для иммунотерапии [27] и для терапии с помощью адресной доставки лекарств [28], мы же показали, что и при терапии частицами этот эффект сохраняется. В то же время через 3 суток после облучения в клетках мутантной по *Stk11* линии значимых различий между контрольной и облученными группами не было выявлено, что свидетельствует о более быстрой адаптации клеток к стрессу, вызванному однократным облучением, по сравнению с клетками LLC1 дикого типа. Важно заметить, что снижение экспрессии *Mki67* на первый взгляд противоречит данным ССК-8-теста, который не подтвердил подавление пролиферации клеток в ответ на облучение в дозе 2 Гр. Однако данные последних лет ставят под сомнение связь Ki-67 и пролиферации опухолевых клеток, подчеркивая, что Ki-67 играет другую роль в туморогенезе, выступая фактором транскрипции и регулятором организации хроматина [20]. Показано, что нокаутные по этому гену клеточные линии становятся более чувствительны к противоопухолевой терапии, поэтому восстановление экспрессии *Mki67* в клетках LLC1-Stk11-Mut до уровня контрольных значений на 3 сутки после воздействия также свидетельствует о более высокой радиорезистентности этого варианта по сравнению с клетками LLC1 дикого типа.

Ген *Pten* – критический ген-супрессор опухолей, играющий важную роль в регуляции роста клеток, выживании и пролиферации; его мутация может привести к неконтролируемому росту и пролиферации клеток, способствуя развитию и прогрессированию adenокарциномы легкого [29,30]. На рис. 8в, 8г показано, что в клетках LLC1 дикого типа нейтроны вызывали временное подавление экспрессии этого гена, что согласуется с данными других исследователей, также наблюдавших снижение экспрессии гена *Pten* в клетках рака легкого LLC1 после облучения однократной

дозой в 2 Гр [31]. На рисунках также видно, что в мутантных по *Stk11* клетках облучение не вызывало значимых изменений уровня экспрессии данного гена, что может указывать на запуск механизмов адаптации опухолевых клеток к терапии и невосприимчивости к определенным видам лечения [32]. Линии рака легкого, мутантные по *Stk11*, устойчивы к терапии блокадой иммунных контрольных точек [33,34], поэтому дальнейшие исследования могут развиваться в области сочетания иммунотерапии и терапии частицами [35].



**Рис. 8.** Оценка экспрессии генов *Mki67*(а, б) и *Pten* (в, г) при облучении частицами линий LLC1 с мутацией в гене *Stk11* и без нее через 1 и 3 суток после облучения. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение. \*  $p < 0.05$ .

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование клеток.** Клеточную линию мышиной adenокарциномы легкого Льюиса LLC1 (любезно предоставлена коллегами из Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали в питательной среде DMEM/F12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Himedia, Индия), 2 мМЛ-глутамина, 50 ед./мл

пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), винкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в атмосфере с влажностью 95%. Все клеточные линии, используемые в работе, были протестированы на отсутствие контаминации микоплазмой с помощью набора MycoReport (Евроген, Россия).

**Внесение STK11-КО с помощью CRISPR/Cas9-системы.** Для создания нокаутирующих

делеций подбирали пары одиночных направляющих sgPHK таким образом, чтобы расстояние между ними было  $>100$  п.н. Подбор и дизайн sgPHK проводили с помощью онлайн-ресурса <https://crispor.gi.ucsc.edu/>, синтез олигонуклеотидов заказывали в компании Люмипроб (Россия). Последовательности sgPHK приведены в табл. 1. Олигонуклеотиды фосфорилировали при помощи полинуклеотидкиназы T4 Polynucleotide Kinase (NEB, США). Векторную плазмиду pU6-sgRNA подвергали рестрикции эндонуклеазой BstV2I (изоизомер BbsI) (СибЭнзим, Россия), дефосфорилировали липкие концы с помощью фосфатазы креветки Shrimp Alkaline Phosphatase (NEB, США) и очищали при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим выделением из геля набором Clean up Standart (Евроген, Россия). Лигирование олигонуклеотидов в вектор проводили с помощью T7 DNA Ligase (NEB, США). Далее проводили трансформацию компетентных клеток *Escherichia coli* XL1-Blue. Клоны анализировали на наличие вставки методом ПЦР с использованием 5X Screen Mix (Евроген, Россия) с последующей визуализацией с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Праймеры для амплификации участка гена, содержащего сайты-мишени sgPHK, определяли с помощью онлайн-ресурса crispor.tefor.net (табл. 2).

**Электропорация клеток, лазерная сортировка.** Для создания значимых делеций с помощью электропорации доставляли в клетки 6 мкг плазмиды pCas9-IRES-EGFP, несущей ген *Cas9* в сочетании с геном маркерного флуоресцентного

белка *eGFP*, а также по 6 мкг пары плазмид (по 3 мкг каждой), несущие sgPHK; для линии LLC1 – пары sgPHK 266 + 365 и 213 + 365. Для одной реакции ресусцинировали  $4 \times 10^6$  клеток в 400 мкл DPBS (ПанЭко, Россия) и добавляли к суспензии смесь плазмид. Электропорацию проводили в электропораторе Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, США) в 0.4-см кюветах при следующих условиях: форма сигнала напряжения – экспоненциальное затухание, электрическая емкость – 500 мкФ, импульсное напряжение – 280 В. После электропорации клеточную суспензию переносили на чашку Петри с культуральной средой.

**FACS, лазерная сортировка флуоресцентно-активированных клеток.** Через 72 ч после электропорации производили сортировку клеток по зеленому сигналу eGFP для обогащения популяции успешно трансфицированными клетками. После культивирования трансфицированные клетки сортировали по сигналу репортерного белка eGFP на приборе BD FACSAria III (BD Bioscience, США), дополнительно окрашивали красителем жизнеспособности 7-аминоактиномицин D (7-AAD, Invitrogen, США). Мертвые клетки детектировали в канале PerCP.

**Отбор клеточных клонов.** Для отбора единичных клонов клетки разводили питательной средой и вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве 50 клеток на планшет. Далее отслеживали лунки, в которых развивались колонии из одной клетки. Клетки собирали, выделяли геномную ДНК при помощи набора реагентов ExtractDNA Blood & Cells (Евроген, Россия).

**Таблица 1.** Последовательности sgPHK для нокаута *Stk11*

Название	Последовательность (5'→3')
gRNA-KO-mSTK11-213-FW	CACCGAGGGCGAGCTGATGTCGGT
gRNA-KO-mSTK11-213-RV	AAACACCGACATCAGCTCGCCCTC
gRNA-KO-STK11-266-FW	CACCGCCTCGGTGGAGTCGATGCGG
gRNA-KO-STK11-266-RV	AAACCCGCATCGACTCCACCGAGGC
gRNA-KO-mSTK11-365-FW	CACCGCTTGACCGCCCTGCGGCATA
gRNA-KO-mSTK11-365-RV	AAACTATGCCGAGGGCGGTCAAGC

**Таблица 2.** Праймеры для амплификации участков, несущих целевые делеции

Название	Последовательность (5→3')	Длина ампликона, п.н.
mSTK11-ontarget-FW	GGACGAGGACAAAGAGTGGG	
mSTK11-ontarget-RV	ATACAGACCCACGAGGTGA	508

Далее проводили ПЦР-анализ с использованием амплификатора ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия) для идентификации мутантных клонов; в табл. 2 приведены последовательности использованных праймеров. Для ПЦР-анализа использовали набор реактивов 5× qPCRmix-HS (Евроген, Россия), смесь для ПЦР в объеме 20 мкл содержала 300 нг ДНК, 0.5 мкМ олигонуклеотидных праймеров. Программа ПЦР: 95°C – 5 мин, затем 45 циклов: денатурация 95°C – 15 с, отжиг 60°C – 15 с, элонгация 72°C – 30 с. Продукты амплификации разделяли в 1%-ном агарозном геле под действием электрического тока, используя камеру для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, Россия).

**Экспозиция клеток адронными пучками.** Клетки снимали с поверхности флакона 75 см<sup>2</sup>, используя 0.05%-ный трипсин-ЭДТА, отмывали от ферментов и переносили в криопробирки для дальнейшей транспортировки и облучения. Клетки находились в суспензии в криопробирках, транспортировку клеток осуществляли в термоконтейнерах с хладоэлементами при 4°C. Облучение клеточных линий протонами, нейtronами и фотонами проводили в г. Обнинск в МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиале ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России в дозе 2 Гр на соответствующих установках. В качестве источника нейтронного облучения использовали генератор нейтронов НГ-14 (разработан в ВНИИА им. Н.Л. Духова, Москва), для фотонной терапии использовали г-терапевтическую установку Рокус-АМ (АО “Ревенство”, Санкт-Петербург), для терапии протонами – протонный комплекс Прометеус (АО “Протон”, Протвино).

**Метод определения жизнеспособности (ССК-8-тест).** Контрольные и облученные нейтронами, протонами и фотонами клетки помещали в количестве по  $15 \times 10^3$  клеток в 100 мкл питательной среды в лунку 96-луночного планшета. Жизнеспособность клеток определяли с помощью набора Cell Counting Kit-8 (ССК-8) (Servicebio,

КНР) в соответствии с протоколом производителя. Результаты детектировали на планшетном спектрофотометре FlexA-200HT (Allsheng, КНР) при длине волны 450 нм.

**ПЦР в реальном времени.** Тотальную РНК выделяли с помощью реагента MagZol (Magen, КНР) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с 0.5 мкг тотальной РНК на реакцию с использованием набора MMLV-RT (Евроген, Россия) при 42°C в течение 40 мин. Смеси для ПЦР в реальном времени готовили в реакционном объеме 20 мкл, содержащем 100 нг кДНК, 0.3 мкМ олигонуклеотидных праймеров (последовательности используемых праймеров указаны в табл. 3) и 4 мкл 5× qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) в трехкратной повторности. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе DT Prime 5 (ДНК-Технология, Россия) с использованием следующей программы ПЦР: начальный этап при 95°C в течение 5 мин, затем 30 циклов: денатурация 94°C – 15 с, отжиг 62°C – 10 с, элонгация 72°C – 20 с. Относительные уровни экспрессии исследуемых генов рассчитывали как  $2^{(-\Delta Ct)}$ , где  $\Delta Ct$  были равны среднему  $Ct$  генов за вычетом среднего  $Ct$  гена сравнения  $\beta$ -2-микроглобулина ( $m\_B2M$ ).

**Аннексин V/пропидия йодидный (PI) тест на жизнеспособность клеток.** Тест аннексин V/PI проводили с использованием набора TransDetect Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit (Trans-Gen, КНР) в соответствии с протоколом производителя. В каждом измерении анализировали не менее  $3 \times 10^4$  клеток. Анализ проводили на приборе LongCye C3111 (Challenbio, КНР) с последующей обработкой результатов с помощью онлайн-ресурса <https://floreada.io/>.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 (Software GraphPad Software, США). Для проверки характера распределения выборки использовали тест Шапиро–Уилка. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с по-

**Таблица 3.** Праймеры для ОТ-ПЦР в реальном времени

Название	Последовательность (5'→3')	
	прямой	обратный
Mo_Pten	GGACCAGAGACAAAAAGGGAGT	CCTTTAGCTGGCAGACCACA
Mo_Mki67	CCTGCCTGTTGGAAGGAGT	AAGGAGCGGTCAATGATGGTT

следующим апостериорным тестом Тьюки использовали для идентификации различий между несколькими группами с нормальным распределением. Непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным критерием Данна использовали для расчета статистических различий для ненормальных распределений. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$  для всех тестов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В качестве релевантной модели рака легкого *in vitro* нами была успешно создана нокаутная делеция гена *Stk11* в клеточной линии аденокарциномы легкого LLC1 с использованием системы CRISPR/Cas9. Подбор пар sgPHK позволил получить значимые делеции, подтвержденные методом ПЦР и сортировкой клеток по экспрессии eGFP. Полученные мутантные линии LLC1-STK11-Mut продемонстрировали гетерозиготный статус, что указывает на сложность получения гомозиготных клонов с полной делецией *Stk11*. Ранее было показано, что в линии LLC1 происходят мутационные процессы, включающие хромосомную нестабильность, спонтанное дезаминирование 5-метилцитозина и дефектное восстановление несоответствий ДНК [36]. В 10-й хромосоме у клеток LLC1 преобладают именно гетерозиготные мутации [36], таким образом, локализованный на 10-й хромосоме ген *Stk11*, вероятно, может быть представлен тремя копиями в случае анеуплоидности линии LLC1 по 10-й хромосоме.

Облучение клеточных культур фотонами, протонами и нейтронами выявило различия в ответе клеток с мутацией *Stk11* и клеток линии LLC1 дикого типа. Облучение однократной фракцией 2 Гр в полях различного качества приводило к радиоиндуцированной стимуляции роста опухолевых клеток, однако для мутантных по *Stk11* клеток этот эффект сохранялся дольше, чем для клеток дикого типа.

В мутантной линии наблюдалось значительное увеличение доли поздних апоптотических и некротических клеток, что свидетельствует о повышенной чувствительности клеток с мутацией *Stk11* к индукторам программируемой клеточной гибели. Однако снижение доли ранних апоптотических клеток и сохранение пролиферации указывает на способность этих клеток к выживанию и регенерации после воздействия частицами.

Облучение вызывало ожидаемое подавление экспрессии регулятора туморогенеза *Mki67* в течение 1 суток после облучения, однако восстановление его экспрессии в клетках LLC1-Stk11-Mut до уровня контрольных значений на 3 сутки после воздействия свидетельствует о более высокой радиорезистентности этого варианта по сравнению с клетками LLC1 дикого типа. Кроме того, облучение не влияло на уровень экспрессии генанонкодирующего гена *Pten* в модифицированных клетках в отличие от клеток исходной линии.

Таким образом, мутация гена *Stk11* приводит к запуску различных механизмов, обеспечивающих устойчивость клеток рака легкого к облучению. Полученная *in vitro* модель может быть использована для дальнейшего изучения механизмов радиорезистентности и возможных путей повышения эффективности радиотерапии у опухолей с данной генетической особенностью.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-45-00031) и в рамках государственного задания “Стимуляция регенерации печени с помощью МСК при развитии синдрома малого остатка” (№ 1025042200021-5).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ЕАГ, ИВА; экспериментальные работы – ЕГА, ИВА, АГС, КМШ, ЕЮК, ДВБ; написание статьи – ЕГА, ИВА, ПАВ, КБГ; анализ данных – ЕАГ, ИВА, ВОС, ДВБ; администрирование проекта – КБГ, ТХФ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

## ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khozyainova A.A., Menyailo M.E., Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A., Geraschenko T.S., Rodionov E.O., Miller S.V., Denisov E.V.* // RUDN J. Med. 2024. V. 28. P. 439–451. <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2024-28-4-439-451>
2. *Spella M., Stathopoulos G.T.* // Cancers (Basel). 2021. V. 13. P. 384. <https://doi.org/10.3390/cancers13030384>
3. *Xin S., Wen M., Tian Y., Dong H., Wan Z., Jiang S., Meng F., Xiong Y., Han Y.* // BMC Cancer. 2025. V. 23. P. 66. <https://doi.org/10.1186/S12957-025-03701-9>
4. *Schabath M.B., Welsh E.A., Fulp W.J., Chen L., Teer J.K., Thompson Z.J., Engel B.E., Xie M., Berglund A.E., Creelan B.C., Antonia S.J., Gray J.E., Eschrich S.A., Chen D.T., Cress W.D., Haura E.B., Beg A.A.* // Oncogene. 2016. V. 35. P. 3209–3216. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.375>
5. *Pons-Tostivint E., Lugat A., Fontenau J.F., Dennis M.G., Bennouna J.* // Cells. 2021. V. 10. P. 3129. <https://doi.org/10.3390/cells10113129>
6. *Facchinetto F., Bluthgen M.V., Tergemina-Clain G., Faivre L., Pignon J.P., Planchard D., Remon J., Soria J.C., Lacroix L., Besse B.* // Lung Cancer. 2017. V. 112. P. 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.06.016>
7. *Mazzaschi G., Leonetti A., Minari R., Gnetti L., Quaini F., Tiseo M., Facchinetto F.* // Curr. Treat. Options Oncol. 2021. V. 22. P. 96. <https://doi.org/10.1007/s11864-021-00891-8>
8. *Zhang C.Y., Sun H., Su J.W., Chen Y.Q., Zhang S.L., Zheng M.Y., Li Y.F., Huang J., Zhang C., Tai Z.X., Cai M., Zhang X.C., Su J., Xu C.R., Yan H.H., Chen H.J., Wu Y.L., Yang J.J.* // Lung Cancer. 2023. V. 175. P. 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.11.016>
9. *Jumaniyazova E.D., Sentyabreva A.V., Kosyreva A.M., Likhonina A.V.* // RUDN J. Med. 2024. V. 28. P. 413–426. <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2024-28-4-413-426>
10. *Kiseleva V., Gordon K., Vishnyakova P., Gantsova E., Elchaninov A., Fatkhudinov T.* // Life (Basel). 2022. V. 12. P. 2071. <https://doi.org/10.3390/life12122071>
11. *Jumaniyazova E., Smyk D., Vishnyakova P., Fatkhudinov T., Gordon K.* // Life (Basel). 2023. V. 13. P. 30. <https://doi.org/10.3390/LIFE13010030>
12. *Mirjolet C., Nicol A., Limagne E., Mura C., Richard C., Morgand V., Rousseau M., Boidot R., Ghiringhelli F., Noel G., Burckel H.* // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 13444. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92942-1>
13. *Qu Y., Zhang B., Liu S., Zhang A., Wu T., Zhao Y.* // Cell. Mol. Immunol. 2010. V. 7. P. 419–427. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.45>
14. *Gordon K., Gulidov I., Fatkhudinov T., Koryakin S., Kaprin A.* // Int. J. Part. Ther. 2022. V. 9. P. 59–69. <https://doi.org/10.14338/IJPT-22-00017>
15. *Stankevicius V., Kuodyte K., Schveigert D., Bulotiene D., Paulauskas T., Daniunaite K., Suziedelis K.* // Oncol. Lett. 2017. V. 13. P. 4190–4200. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.5877>
16. *Fasola C.E., Jones J.C., Huang D.D., Le Q.T., Hoppe R.T., Donaldson S.S.* // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2013. V. 86. P. 930–935. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2013.04.035>
17. *Schaub L., Harrabi S.B., Debus J.* // Br. J. Radiol. 2020. V. 93. P. 20200183. <https://doi.org/10.1259/bjr.20200183>
18. *Kuwahara Y., Mori M., Kitahara S., Fukumoto M., Ezaki T., Mori S., Echigo S., Ohkubo Y., Fukumoto M.* // Cancer Med. 2014. V. 3. P. 310–321. <https://doi.org/10.1002/CAM4.185>
19. *Mardynsky Y.S., Gulidov I.A., Ivanov S.A., Kaprin A.D., Gordon K.B.* // Radiat. Risk. 2024. V. 33. P. 40–54. <https://doi.org/10.21870/0131-3878-2024-33-1-40-54>
20. *Hardie D.G., Alessi D.R.* // BMC Biol. 2013. V. 11. P. 36. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-36>
21. *Pierce S.E., Granja J.M., Corces M.R., Brady J.J., Tsai M.K., Pierce A.B., Tang R., Chu P., Feldser D.M., Chang H.Y., Bassik M.C., Greenleaf W.J., Winslow M.M.* // Nat. Cell Biol. 2021. V. 23. P. 915–924. <https://doi.org/10.1038/S41556-021-00728-4>
22. *Urruticoechea A., Smith I.E., Dowsett M.* // J. Clin. Oncol. 2005. V. 23. P. 7212–7220. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.501>
23. *Oh M., Tanaka T., Kobayashi M., Furukawa T., Mori T., Kudo T., Fujieda S., Fujibayashi Y.* // Nucl. Med. Biol. 2009. V. 36. P. 419–426. <https://doi.org/10.1016/J.NUCMEDBIO.2009.01.016>
24. *van Gogh M., Garzon J.F.G., Sahin D., Knopfova L., Benes P., Boyman O., Jurisica I., Borsig L.* // Cancer Immunol. Res. 2023. V. 11. P. 1432–1444. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-22-0912>
25. *Andrés-Sánchez N., Fisher D., Krasinska L.* // J. Cell Sci. 2022. V. 135. P. jcs258932. <https://doi.org/10.1242/jcs.258932>
26. *Mrouj K., Andrés-Sánchez N., Dubra G., Singh P., Sobecki M., Chahar D., Al Ghoul E., Aznar A.B., Prieto S., Pirot N., Bernex F., Bordignon B., Hassen-Khodja C., Villalba M., Krasinska L., Fisher D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118. P. e2026507118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2026507118>

27. *Zhang Y.P., Guo Z.Q., Cai X.T., Rong Z.X., Fang Y., Chen J.Q., Zhuang K.M., Ruan M.J., Ma S.C., Lin L.Y., Han D.D., Li Y.S., Wang Y.Y., Wang J., Cao C.H., Tang X.R., Xie Q.K., Chen Y., Lin Y., Le Tan J., Yu Z.H., Wu Z.N., Wei W., Zheng D.Y., Zeng Y.J., Ruan Y.C., Xu Z.P., Gu J.Z., Xiao L.S., Liu L., Guan J., Bai X., Wu D.H., Dong Z.Y.* // *Cancer Cell.* 2025. V. 43. P. 856–874.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2025.02.024>
28. *Jung S., Jiang L., Zhao J., Shultz L.D., Greiner D.L., Bae M., Li X., Ordikhani F., Kuai R., Joseph J., Kasinath V., Elmaleh D.R., Abdi R.* // *Bioeng. Transl. Med.* 2023. V. 8. P. e10273. <https://doi.org/10.1002/btm2.10273>
29. *Exposito F., Redrado M., Houry M., Hastings K., Molero-Abraham M., Lozano T., Solorzano J.L., Sanz-Ortega J., Adradas V., Amat R., Redin E., Leon S., Legarra N., Garcia J., Serrano D., Valencia K., Robles-Oteiza C., Foggetti G., Otegui N., Felip E., Lasarte J.J., Paz-Ares L., Zugazagoitia J., Politi K., Montuenga L., Calvo A.* // *Cancer Res.* 2023. V. 83. P. 2513–2526. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-2900>
30. *Lázaro S., Lorz C., Enguita A.B., Seller I., Parhamo J.M., Santos M.* // *Cancers (Basel).* 2022. V. 14. P. 3671. <https://doi.org/10.3390/cancers14153671>
31. *Stankevicius V., Kuodyte K., Schveigert D., Bulotiene D., Paulauskas T., Daniunaite K., Suziedelis K.* // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. P. 4190–4200. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5877>
32. *Vallabhaneni S., Liu J., Morel M., Wang J., De-Mayo F.J., Long W.* // *Mol. Oncol.* 2022. V. 16. P. 1184–1199. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13173>
33. *Long L.L., Ma S.C., Guo Z.Q., Zhang Y.P., Fan Z., Liu L.J., Liu L., Han D.D., Leng M.X., Wang J., Guo X.J., Le Tan J., Cai X.T., Lin Y., Pan X., Wu D.H., Bai X., Dong Z.Y.* // *Cancer Res.* 2023. V. 83. P. 568–581. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-22-1740>
34. *Bai X., Guo Z.Q., Zhang Y.P., Fan Z.-Z., Liu L.J., Liu L., Long L.L., Ma S.C., Wang J., Fang Y., Tang X.R., Zeng Y.J., Pan X., Wu D.H., Dong Z.Y.* // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. P. 1247. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36892-4>
35. *Kitajima S., Tani T., Springer B.F., Campisi M., Osa-ki T., Haratani K., Chen M., Knelson E.H., Mahadevan N.R., Ritter J., Yoshida R., Köhler J., Ogino A., Nozawa R.S., Sundararaman S.K., Thai T.C., Homme M., Piel B., Kivlehan S., Obua B.N., Purcell C., Yajima M., Barbie T.U., Lizotte P.H., Jänne P.A., Paweletz C.P., Gokhale P.C., Barbie D.A.* // *Cancer Cell.* 2022. V. 40. P. 1128–1144.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.08.015>
36. *He Q., Sun C., Pan Y.* // *Sci Rep.* 2024. V. 14. P. 100. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50703-2>

# Effect of STK11 Mutation in the LLC1 Mouse Lewis Lung Adenocarcinoma Line on Sensitivity to Particle Radiotherapy

**E. A. Gantsova<sup>\*, \*\*, #</sup>, I. V. Arutyunyan<sup>\*, \*\*</sup>, A. G. Soboleva<sup>\*, \*\*</sup>, K. M. Shakirova<sup>\*, \*\*\*</sup>,  
E. Yu. Kananykhina<sup>\*\*</sup>, D. V. Balchir<sup>\*</sup>, P. A. Vishnyakova<sup>\*</sup>, V. O. Saburov<sup>\*\*\*\*</sup>,  
K. B. Gordon<sup>\*, \*\*\*\*</sup>, and T. Kh. Fathkudinov<sup>\*, \*\*</sup>**

<sup>#</sup> Phone: +7 (495) 433-27-94; e-mail: gantsova\_ea@rudn.ru

*\* Research Institute of Molecular and Cellular Medicine,  
Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),  
ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow 117198 Russia*

*\*\* A.V. Avtysyn Research Institute of Human Morphology, P.G. Petrovsky National Research Center of Surgery,  
ul. Tsyurupy 3, Moscow 117418 Russia*

*\*\*\* N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow 117997 Russia*

*\*\*\*\* A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of the National Medical Research Center  
for Radiology, Ministry of Health of the Russian Federation,  
ul. Koroleva 4, Ochninsk 249036 Russia*

Lung adenocarcinoma is a malignant tumor, which is the most common type of non-small cell lung cancer. Low efficiency of standard methods of treatment of lung adenocarcinoma with mutation of the *Stk11* tumor suppressor gene is a serious problem in clinical practice. Search and improvement of new therapeutic approaches to this disease remains an urgent task of modern biomedicine. The aim of the work was to create an *in vitro* model of lung cancer based on the LLC1 cell line with knockout of the *Stk11* gene to assess the sensitivity of mutant cells to various types of radiation therapy, including irradiation with photons, protons and neutrons. The main methods used were CRISPR/Cas9 genome editing technologies to obtain mutant clones, laser cell sorting, PCR analysis to confirm the deletion, as well as assessment of viability, proliferation (metabolic tests, *Mki67* marker expression), apoptosis induction (annexin V-PI method) and *Pten* gene expression after cell irradiation with a dose of 2 Gy. As a result, heterozygous mutant lines LLC1-STK11-Mut were obtained. Cell irradiation revealed that in *Stk11* mutant cells, radio-induced growth stimulation persisted longer than in wild-type cells, and a significant increase in the proportion of late apoptotic and necrotic cells was observed. At the same time, *Mki67* expression temporarily decreased after irradiation, but quickly recovered in mutant cells, which indicates their higher radioresistance. Unlike wild-type cells, the expression level of the *Pten* gene in mutant cells did not change significantly after irradiation. Thus, the *Stk11* mutation contributes to the formation of radioresistance in tumor cells by triggering various adaptation mechanisms. The obtained *in vitro* model can be used for further study of radioresistance and development of new approaches to the therapy of tumors with *Stk11* mutation.

**Keywords:** lung adenocarcinoma, serine/threonine kinase 11 (STK11), hadron therapy, particle therapy, cancer immunotherapy