

# Estudio de la expresión diferencial génica al eliminar CD44 en células no pequeñas de cáncer de pulmón.

Laura Díez Silgo<sup>1, 2, a</sup>, Magdalena Abraham Molero<sup>2</sup>, Jon Zugazagoitia Fraile<sup>2, 3</sup>

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de Investigación en Microambiente Tumoral e Inmunoterapia. Instituto de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid. 3. Departamento de Oncología Médica. Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

a. lauradieszilgo@gmail.com

**Palabras clave:** CD44, CPCNP, biomarcador, PD-1, PD-L1, expresión génica, inmunoterapia

## Resumen

CD44 es una glicoproteína de membrana que se encuentra sobre expresada en ciertos cánceres y que se ve implicada en varios mecanismos tumorales como la transición epitelio mesénquima (EMT), metástasis, resistencia a apoptosis y supresión de la respuesta inmune antitumoral. En el estudio realizado por *Moutafi, Molero et al* se describió que las células del compartimento tumoral que expresaban más CD44 correspondían a pacientes que presentaban una mayor supervivencia libre de progresión tras el bloqueo del eje PD-1, sugiriendo que CD44 podría ser un posible biomarcador. Gracias a estos hallazgos, surge la necesidad de investigar la relación que tiene la alta expresión de CD44 al bloquear el eje PD1/PD-L1. Por ello, se ha diseñado este estudio, donde se ha realizado un análisis de la expresión génica diferencial en una línea celular de cáncer de pulmón (CPCNP), H520, en la que previamente se le había eliminado CD44 por métodos genéticos utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 y donde se observó una disminución de expresión génica de algunos genes implicados en la vía de señalización de IFN $\gamma$ , como *CD274*, *IRF1* y *IFNGR2*. Se validó por citometría de flujo que la expresión proteica de CD44 y PDL1 correspondían con los datos obtenidos de expresión génica.

**Cita:** Díez Silgo, Laura; Abraham Molero, Magdalena; Zugazagoitia Fraile, Jon (2023) Estudio de la expresión diferencial génica al eliminar CD44 en células no pequeñas de cáncer de pulmón. *dianas* 12 (2): e202309fa02. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202309fa02](https://journal.dianas.web.uah.es/journal/e202309fa02) <https://dianas.web.uah.es/journal/e202309fa02>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>. DOI <https://doi.org/10.37536/DIANAS>

**Copyright:** © Díez-Silgo L, Abraham-Molero M, Zugazagoitia-Fraile J. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

El cáncer de pulmón es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en los últimos años y una de las principales causas de muerte. Este tipo de cáncer tiene una alta tasa de mortalidad y, por tanto, una baja supervivencia, debido principalmente a que su diagnóstico suele ser en etapas avanzadas [1]. El cáncer de pulmón se puede clasificar en dos tipos diferentes según su histología, el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Este último se subdivide en adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes y tumor carcinoide bronquial [2].

En los últimos diez años, el descubrimiento e introducción de la inmunoterapia e inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI) ha conseguido una mejora en el tratamiento de CPCNP incrementando la supervivencia de los pacientes [3].

Una característica de los tumores es la capacidad que tienen de evadir el sistema inmune mediante mecanismos como la expresión de ligandos de ICI, entre ellos PD1/PD-L1 [4]. El ligando del punto de control inmunitario PD-L1 a menudo se sobre expresa en diversos cánceres para inhibir las células T y conseguir evadir el sistema inmune. Se trata de una proteína transmembrana que se une al receptor inhibitorio PD-1 expresado en las células T y que provoca la inhibición de la respuesta inmune [5]. Este eje PD1/PD-L1 se ve activado por la estimulación de linfocitos con IFN $\gamma$ , donde este se une a su receptor de superficie celular específico, un heterodímero formado por IFNGR1 e IFNGR2; de esta manera, se activan JAK1 y JAK2 que fosforilan a STAT1. STAT1 fosforilado (pSTAT1) se transloca al núcleo y activa la expresión de genes, donde destaca IRF1, un factor de transcripción. IRF1 permite la expresión de *CD274*, gen que codifica para PD-L1. Finalmente, PD-L1 se transloca a la superficie de la membrana donde interaccionará con PD1 de las células T [6].

Por ello, el hallazgo de un anticuerpo monoclonal que bloquea la acción de PD1 y PD-L1 ha sido un cambio esencial en el tratamiento de cáncer de pulmón; y, en combinación con quimioterapia, se han obtenido buenos resultados en los pacientes, mejorando notablemente su calidad de vida. Sin embargo, la respuesta a este tratamiento se limita a un subconjunto de pacientes y además se desconoce el mecanismo de

resistencia y sensibilidad a inhibidores del eje PD1, por lo que se requiere estudio y caracterización de nuevos biomarcadores [7].

CD44 es una glicoproteína transmembrana que se encuentra fisiológicamente en varios tipos de células, como en linfocitos, músculo liso, fibroblasto y varios tipos de epitelios [8]. Esta proteína es codificada por 19 exones, dando lugar a diversas isoformas mediante splicing alternativo. La isoforma más común es la CD44s [9]. Se trata de un receptor cuyo ligando principal es el ácido hialurónico (AH), componente principal de la matriz extracelular (MEC) [10]. La unión de este ligando produce un cambio conformacional de la proteína, permitiendo la activación de diversas vías de señalización implicadas en proliferación, adhesión, migración e invasión [9], [11]. Por otra parte, se ha descrito que la sobre expresión de CD44 se ve implicada en diversas vías que ayudan al mantenimiento y progresión del tumor, entre las que destaca la transición epitelio-mesénquima (EMT), resistencia a apoptosis [12], [13] y metástasis [14], [15]. Se han asociado niveles elevados de CD44 con varios tipos de cánceres como cáncer de mama [8], de próstata y de ovario y que se correlaciona con un cáncer más agresivo y con peor pronóstico [16].

Por otra parte, en varios estudios se describe el papel que tiene CD44 en la supresión de la respuesta inmune antitumoral. Se ha observado en células de cáncer de cabeza y cuello y cáncer de mama que sobre expresan CD44 también expresan de manera elevada PD-L1 y permiten, a su vez, la supresión de las células T, favoreciendo la evasión del sistema inmune [17]. En otro estudio, se correlacionó CD44 con la expresión de PD-L1 tanto a nivel proteico como transcripcional en muestras de pacientes con CPCNP y con cáncer de mama triple negativo (CMTN) [18].

En un estudio realizado por *Moutafi, Molero et al* cuyo objetivo era la validación y descubrimiento de marcadores para el tratamiento de CPCNP, se asocia una alta expresión de CD44 a mayor sensibilidad al inhibidor del eje PD1 y, por ende, a un mejor pronóstico del CPCNP y mayor supervivencia. Estos hallazgos se obtuvieron gracias a la tecnología GeoMx™ Digital Spatial Profiling (DSP) y fueron validados en una cohorte de pacientes en el Hospital 12 de Octubre que fueron tratados con inhibidores de PD1 y PD-L1 [7]. Este descubrimiento sugiere que CD44 podría ser un biomarcador de sensibilidad a los inhibidores del eje PD1/PL-L1 en el CPCNP, y, en consecuencia, surge la necesidad de investigar el mecanismo por el cual la sobre expresión de CD44 puede inducir mayor sensibilidad al bloqueo del eje PD-1. Debido a estos hallazgos se ha decidido diseñar este estudio donde se realizó una caracterización de expresión génica en células de cáncer de pulmón humanas que carecen de expresión de CD44 comparándolas con su control, para conseguir entender en profundidad la relación de CD44 con la vía de señalización de PD1/PD-L1.

## Materiales y métodos

### Cultivos celulares

Anteriormente, en el laboratorio, se generaron, a partir de una línea celular de cáncer de pulmón de célula no pequeña humana procedentes de un carcinoma escamoso, llamada H520, dos líneas celulares: H520 PLC vacío y H520 CD44 KO1F, utilizando la tecnología CRISPR/Cas9. Se diseñó un plásmido, pLentiCRISPRv2 (*Addgene n°52961*; <http://www.addgene.org/52961/>) (Figura 1S) que permitiese generar un codón de stop permanente en el gen de CD44 para que esta proteína no se traduzca. De esta manera, se generó una línea celular estable que no es capaz de expresar CD44. Como control, se sometieron a las células al mismo proceso de infección, pero con el plásmido vacío (PLC), es decir, sin la secuencia de CD44. En estas células se comprobó, por secuenciación, citometría y Western Blot, si las células expresaban o no CD44 (Figura 2S). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 GlutaMAX (*Gibco*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *Sigma*) y 1% de antibióticos a 37°C en condiciones de humedad de 5% CO<sub>2</sub>. Las células procedentes de cultivos de mantenimiento se tripsinizaron y se contaron con una cámara de Neubauer. A continuación, en placas de 6 pocillos, se sembraron de cada tipo celular por triplicado 200.000 células por pocillo en RPMI y se cultivaron durante 24 horas en un incubador a 37°C en condiciones de humedad de 5% de CO<sub>2</sub>.

### Extracción y aislamiento de ARN total

El aislamiento del ARN de la línea celular H520 se realizó en condiciones óptimas mediante el RNeasy Mini Kit (*Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se resuspendió en 30 µl de agua libre de ARNasas. La concentración y la calidad del ARN extraído de cada muestra se determinó con el Nanodrop (*ThermoScientific*).

### Cuantificación de la expresión génica con la tecnología nCounter

Se llevó a cabo una caracterización de la expresión génica de la línea H520 PLC y H520 CD44 KO1F mediante el nCounter (*NanoString*). Para ello, se utilizaron 200ng de ARN como indican las instrucciones del fabricante (Input ARN estándar recomendado: 50-300ng totales) y se siguió el manual del ensayo (*MAN-10056-03 (January 2020) CodeSet Hybridization Setup*). El panel de expresión génica empleado se llama PanCancer IO 360 y analiza la expresión génica de 770 genes implicados en evasión inmune y

microambiente tumoral. El ARN se sometió a la hibridación con las sondas marcadas con biotina y sondas indicadoras marcadas con fluorescencia durante 18h a 65°C en un termociclador. Estas sondas tienen un código de barras único por cada gen; se trata de cebadores que se unen específicamente a una secuencia de ARN concreta, detectando un gen específico. A continuación, en la Prep-Station, los complejos de sondas y ARN fueron inmovilizados y alineados en un soporte sólido, y los complejos libres fueron eliminados mediante diversos lavados. Por último, mediante la máquina nCounter, la muestra fue escaneada por microscopía de fluorescencia automatizada, realizándose una lectura y conteo de los códigos de barras específicos. Los datos, a continuación, fueron normalizados y analizados (Figura 1).

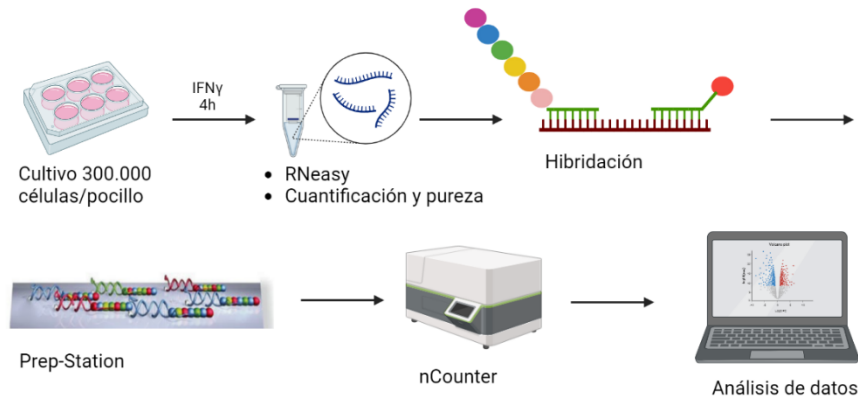


Figura 1.- Esquema del flujo de trabajo de la tecnología nCounter.

### Análisis de datos por ROSALIND

Los datos obtenidos en el nCounter fueron analizados con una arquitectura HyperScale desarrollada por ROSALIND, Inc. (San Diego, CA). La normalización, los Fold Changes ( $\geq +2$ -fold y  $\leq -2$ -fold) y los p valores ajustados ( $< 0,05$ ) son calculados según el criterio establecido por *NanoString* que utiliza una normalización estándar. Para el análisis comparativo de expresión diferencial, se utilizó un test estadístico multivariable con corrección del valor p utilizando el método de Benjamini-Hochberg para estimar el radio de falsos descubrimientos (FDR).

### Normalización y control de calidad

Se procedió a comprobar que las muestras y sus triplicados pasaron el control de calidad (QC), mediante la comprobación de los parámetros de Imagen y de Densidad de Unión. A continuación, para ver si los controles positivos pasaron el control de calidad, se evaluó la linealidad de los controles positivos y la detección de límites. Por último, se realizó una inspección visual global de los datos. Las muestras y los triplicados de este estudio pasaron el control de calidad ya que se observa buenos resultados al evaluar los parámetros que se muestran en la Tabla 1. La calidad de Imagen (*Imaging Quality*) debe ser superior al 75%, la calidad de unión (*Binding Quality*) debe estar entre 0,1 y 2,5 y la linealidad de los controles positivos (*Control Linearity*) debe ser mayor de 0,97.

Muestra	Imaging Quality	Binding Quality	Control Linearity
H520 CD44 KO1	0.944	0.72	0.99
H520 CD44 KO2	0.953	0.87	0.99
H520 CD44 KO3	0.954	0.64	0.99
H520 PLC1	0.951	0.9	0.99
H520 PLC2	0.967	0.87	0.99
H520 PLC3	0.953	0.87	0.99

Tabla 1.- Resultado de los parámetros del control de calidad.

A continuación, para poder analizar los datos obtenidos en el nCounter, los datos crudos tuvieron que ser normalizados. La normalización de datos está diseñada para eliminar fuentes de variabilidad técnica de un experimento y se realizó mediante el software Rosalind. Esta plataforma permite subir la cuantificación de las sondas del panel del nCounter y calcula la normalización, los Fold Changes y los valores p según el criterio establecido por NanoString. Se realizó una normalización estándar que se trata de la combinación de una normalización de control positivo, que emplea controles positivos y negativos sintéticos, y la normalización del contenido del CodeSet, que utiliza genes *housekeeping*, permitiendo la corrección de la variabilidad del input de la muestra. Los genes *housekeeping* que se emplearon en el CodeSet son sondas de ARNm que se expresan de manera constitutiva en todas las células y muestran poca o ninguna

variabilidad de expresión en respuesta a diferentes condiciones y/o tratamientos. Por ello, la expresión de éstos solo variará según la cantidad de ARN de muestra cargado. Se observó poca variabilidad entre muestras (Figura 2A-B) y, por lo tanto, los datos fueron normalizados sin ningún problema para el posterior análisis.

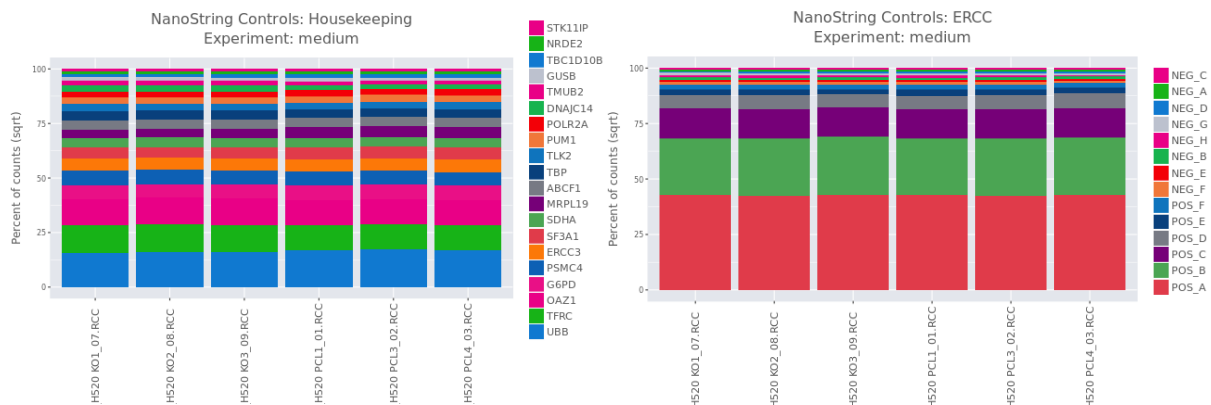


Figura 2.- (Izquierda) Gráfico que muestra el nivel de expresión de los genes housekeeping en las diferentes muestras. (Derecha) Gráfico que muestra los recuentos de los controles positivos y negativos combinados en las diferentes muestras. En ambos gráficos se utiliza la raíz cuadrada del nivel de expresión para mostrar aquellos valores más bajos. Cada columna suma 100.

### GraphPad Prism

Los gráficos presentados en este estudio fueron generados mediante GraphPad Prism. Los datos se importaron de los análisis obtenidos por ROSALIND y se seleccionó el tipo de gráfico.

### Citometría de flujo

Para el análisis de CD44 y PD-L1, las células H520 PLC y H520 CD44 KO1F se tripsinizaron, centrifugaron, lavaron y se bloquearon durante 30 minutos con PBS-BSA 1%. A continuación, se tiñeron durante 30 minutos con el anticuerpo anti-CD44 (human) marcado con FITC, un anticuerpo anti-PD-L1 (human) marcado con PE y con DAPI como marcador de viabilidad celular. Las muestras fueron analizadas en citómetro FACSCalibur (*Becton Dickinson*), empleando el software FlowJo (*Tree Star*).

## Resultados

### Aislamiento de ARN de las células H520 PLC vacío y H520 CD44 KO1F

Se aisló el ARN en condiciones óptimas siguiendo el protocolo del kit *Qiagen*. Se cuantificó con el Nanodrop, obteniendo la ratio de absorbancia 260/280 y la concentración de ARN en ng/μl (Tabla 2). El análisis de la ratio de absorbancia 260/280 del ARN se empleó como medida de pureza de las muestras. Se trata de la relación de absorbancia que se determina mediante espectrofotometría y nos da información acerca de la cantidad de contaminantes presentes en el ARN. Una ratio 260/280 cercana a 2 indica alta pureza y buena calidad de la muestra de ARN. En nuestro estudio, los resultados muestran que todas las muestras son de buena calidad y alta pureza, ya que se obtuvieron una ratio cercana a 2. Además, los triplicados tienen concentraciones similares, lo que evidencia una correcta ejecución del procedimiento.

Línea celular	Ratio 260/280	Concentración RNA (ng/ul)
H520 PLC 1	2,09	500,8
H520 PLC 2	2,02	552,2
H520 PLC 3	2,10	513,3
H520 CD44 KO1F 1	2,08	458,3
H520 CD44 KO1F 2	2,10	558,4
H520 CD44 KO1F 3	2,06	626,8

Tabla 2.- Cuantificación y ratio de absorbancia 260/280 que determina pureza de los triplicados de las líneas celulares H50 PLC y H520 CD44 KO1F.

### Análisis de la expresión génica de las líneas comparando la línea H520 PLC vs H520 CD44 KO1F mediante la tecnología nCounter

Se realizó un análisis comparativo de expresión diferencial de los 2 tipos celulares utilizando un test estadístico multivariable con corrección del valor p utilizando el método de Benjamini-Hochberg para estimar el radio de falsos descubrimientos (FDR) y representando los datos en un Volcano Plot (Figura 3).

En esta representación se muestra un diagrama de dispersión donde muestra la expresión diferencial entre dos grupos; en este caso, se diferencia la media del contejo de genes en cada línea; PLC y CD44-KO. Para ello, se calcula el logaritmo en base 2 ( $\text{Log}_2$ ) del cociente de las medias de los genes de H520 CD44 KO entre H520 PLC.

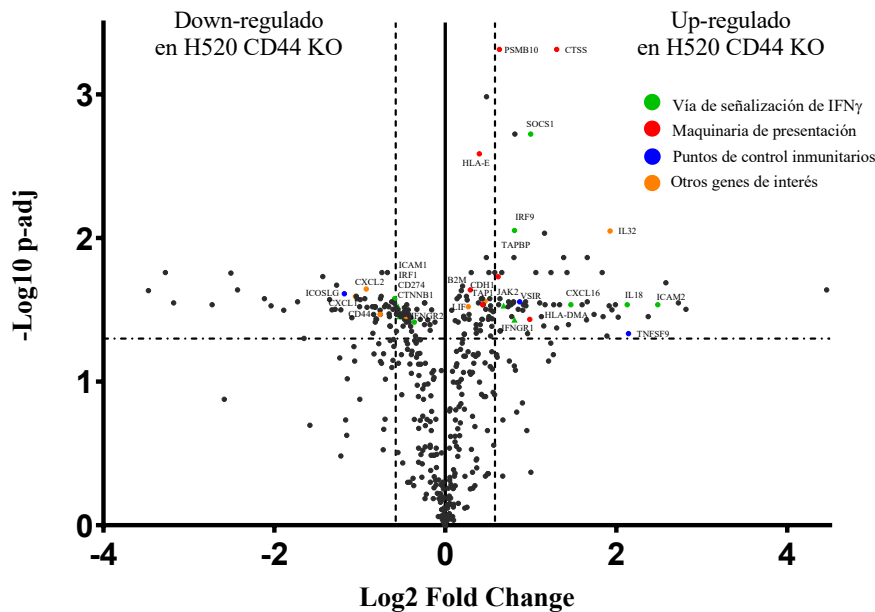


Figura 3.- Representación en Volcano Plot la expresión diferencial entre las dos líneas celulares.

En el eje Y se muestra el logaritmo en base -10 ( $-\text{Log}_{10}$ ) del valor p ajustado (p-adj), marcando el límite de significancia en  $p\text{-adj} < 0,05$ , (que es igual a 1,3 si se calcula el  $-\text{Log}_{10}$  de 0,5). Dicho de otra forma, los genes que se encuentran por encima del límite de 1,3 son estadísticamente significativos, es decir, es más seguro que la diferencia que hay entre las líneas sea cierta. En el eje X se muestra el logaritmo en base 2 del Fold Change (FC); se trata de una medida que describe cuánto cambia la expresión de un gen en una línea respecto a la otra. En este caso, estamos dividiendo CD44-KO entre PLC; de esta manera, un gen que tenga un FC de 2 representa que en CD44-KO ese gen se expresa el doble que en PLC. Se marcó el límite en  $\text{FC}=1,5$ , es decir, en  $\text{Log}_2 \text{FC}=0,58$ .

A			
Vía de señalización de $\text{IFN}\gamma$			
Gen	$\text{Log}_2$ Fold Change	p valor ajustado	
CD274	-0,55	0,03	
IFNGR1	0,8	0,03	
IRF1	-0,53	0,03	
JAK2	0,68	0,03	
CXCL16	1,47	0,03	
ICAM1	-0,59	0,02	
IFNGR2	-0,36	0,03	
IL18	2,12	0,03	
IRF9	0,8	0,01	
SOCS1	1	0,001	

B			
Maquinaria de presentación			
Gen	$\text{Log}_2$ Fold Change	p valor ajustado	
B2M	0,29	0,020	
CTSS	1,30	0,000	
HLA-DMA	0,98	0,030	
HLA-E	0,39	0,002	
PSMB10	0,63	0,000	
TAP1	0,44	0,030	
TAPBP	0,61	0,018	

C			
Puntos de control inmunitarios			
Gen	$\text{Log}_2$ Fold Change	p valor ajustado	
ICOSLG	-1,18	0,02	
TNFSF9	2,14	0,04	
VSIR	0,87	0,03	

Tabla 3: listado de genes implicados en (A) la vía de señalización de  $\text{IFN}\gamma$ , (B) la maquinaria de presentación de antígenos y, (C) puntos de control inmunitarios. Cada gen muestra su  $\text{Log}_2$  FC y su p valor ajustado.

Podemos ver que, en las células que no expresan CD44, se produce un cambio en la expresión de genes relacionados con microambiente tumoral y evasión inmune. Para analizarlos, se dividieron en grupos de genes diferentes, clasificado por colores en el gráfico y marcando sólo aquellos genes significativos. En color verde, observamos genes de la vía de  $\text{IFN}\gamma$ , y donde se ve que algunos genes están sobre regulados en la línea del CD44-KO, tales como *IFNGR1* (receptor 1 de  $\text{IFN}\gamma$ ), *CXCL16* (quimioquina inducida por  $\text{IFN}\gamma$ ) y *IL18* (citoquina proinflamatoria que estimula la secreción de  $\text{IFN}\gamma$ ), y otros se encuentran infra regulados, como *CD274* (codifica para PD-L1, que es una proteína con papel inmunorregulador), *IRF1*

(factor de regulación de  $IFN\gamma$ ) y *IFNGR2* (receptor 2 de  $IFN\gamma$ ) (Tabla 3A). En azul y en rojo vemos genes implicados en la maquinaria de presentación y puntos de control inmunitarios respectivamente. La mayoría de los genes significativos clasificados dentro de estos grupos tienden a sobre regularse en la línea CD44-KO (Tabla 3B-C).

Por otro lado, podemos observar que las células CD44-KO expresan de manera más elevada genes implicados en la maquinaria de presentación de antígenos, ya que observamos un FC positivo con un p valor ajustado significativo en los genes clasificados dentro de esta ruta (Tabla 3).

A continuación, quisimos ver si en las células sin expresión de CD44 se produce alguna diferencia respecto a rutas; para ello, se realizó un *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) en rutas de genes descritas por el panel IO360 de NanoString. Si estos genes muestran un cambio común y la base de datos los considera de una ruta específica, esa ruta saldrá significativa. Los resultados obtenidos muestran que hay una ruta que se ve alterada al realizar el CD44-KO, sobre expresándola (Figura 4).

Se trata de una ruta que la base de datos de *NanoString* nombra “*Immune cell localization to tumors*”, y se encuentra sobre expresada; este resultado coincide con los datos de la Tabla 3 donde observamos que los genes implicados en la maquinaria de presentación se hallan sobre regulados en las células CD44-KO, reafirmando su implicación en la respuesta inmunitaria.

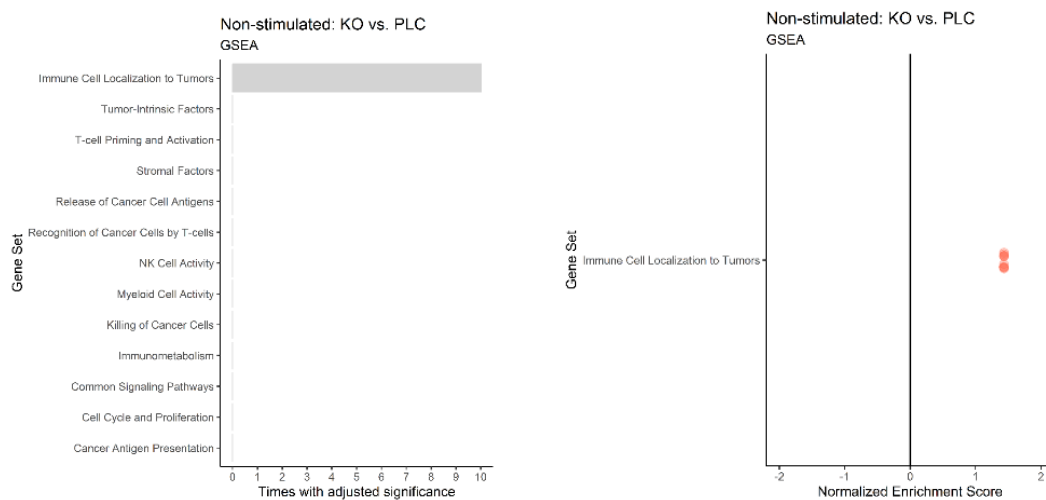


Figura 4.- GSEA con 14 sets de genes de *NanoString*.

#### Análisis de la expresión proteica por citometría de CD44 y PD-L1

Por último, para validar la infra regulación de PD-L1 en las células H520 CD44 KO1F en comparación con las H520 PLC, se realizó un análisis de la expresión proteica de CD44 y PD-L1 mediante citometría de flujo. Para ello, se incubaron los 2 tipos celulares con anti-CD44 marcados con el fluoróforo FITC, anti-PDL1 marcado con el fluoróforo PE y DAPI para visualizar la viabilidad celular.

En los resultados obtenidos se observó menor expresión de PD-L1 en aquellas células ausentes de CD44 (Figura 5); esto coincide con los resultados anteriores sobre la infra regulación del gen *CD274* cuando CD44 no está presente en las células.

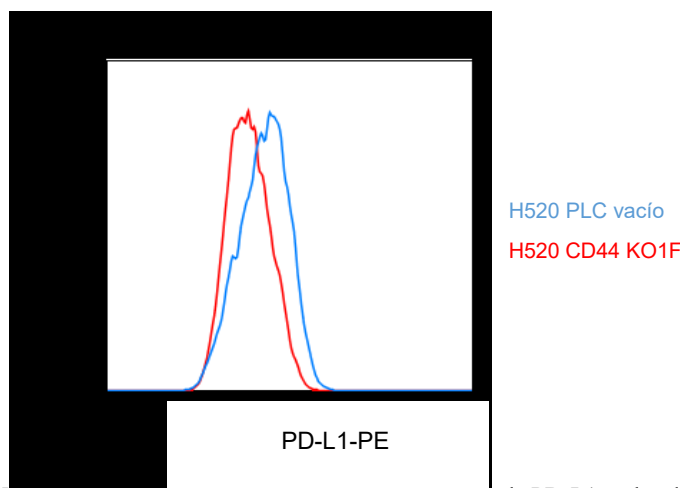


Figura 5.- Histograma que representa la expresión proteica de PD-L1 en los dos tipos celulares, H520 PLC y H520 CD44 KO1F, mediante citometría de flujo.

## Discusión

En los últimos años, se ha observado un creciente interés en el estudio de CD44., ya que se ha descrito que en varios tumores esta proteína se ve sobre expresada y que, además, se ve implicada en diversas vías que ayudan al mantenimiento y progresión del tumor, como EMT, resistencia a apoptosis y metástasis [12], [13], [14], [15]. Además, se ha asociado con varios tumores como un cáncer más agresivo y de peor pronóstico. [8], [16]. También se ha observado que CD44 está implicado en la supresión de la respuesta inmune antitumoral. En varios estudios, se describe que las células CD44 positivas en cáncer de cabeza y cuello y cáncer de mama expresan de manera elevada PD-L1 en diferentes cánceres, favoreciendo la evasión del sistema inmune [17], [18].

Por ello, es importante investigar más a fondo el papel que tiene CD44 en el cáncer y ver la posible relación que puede haber con una mejora clínica. De hecho, *Moutafi, Molero et al.* llevaron a cabo un estudio con el propósito de validar y descubrir marcadores para el tratamiento de CPCNP, donde se encontró una correlación significativa entre una alta expresión de CD44 y mayor supervivencia libre de progresión tras la inmunoterapia [7]. Gracias a estos hallazgos, surge la necesidad de investigar la relación de CD44 y el eje PD1/PD-L1.

Por ello, se ha decidido diseñar este estudio donde se quiere investigar cómo CD44 afecta a esta vía de señalización, mediante la comparación tanto a nivel proteico como transcripcional de dos líneas celulares, el control (H520 PLC) y una línea donde se realizó un KO de la proteína CD44 (H520 CD44 KO1F). Los resultados muestran, en conjunto, una relación entre la ausencia de CD44 y una ligera disminución de la vía de señalización activada por IFN $\gamma$ , como la expresión génica de *IRF1* y *IFNGR2*, entre otros, y donde destaca una disminución significativa, tanto a nivel transcripcional como proteico, de PD-L1; proteína implicada en la vía de señalización de IFN $\gamma$ , y diana principal de la inmunoterapia anti PD1/PD-L1. Esto sugiere que cuando se sobre expresa, quizá la vía se encuentre más activada y por esa razón puede ser más sensible a la inmunoterapia, si bien precisan más estudios para confirmar esta hipótesis. También se observa que algunos genes de esta ruta se sobren regulan; esto nos confirma que CD44 afecta a esta vía de señalización y sugiere que quizá ese cambio se acompaña de mecanismos compensatorios de la respuesta inmune antitumoral.

Por otro lado, CD44 también parece estar relacionado con la presentación antigénica, ya que se ha visto un aumento de expresión de genes implicados en la maquinaria de presentación en las células que no expresan CD44 frente a las que sí expresan. Estos resultados confirman la implicación que tiene CD44 en la respuesta inmune antitumoral, donde se ha visto que actúa suprimiéndola, dando ventaja al tumor. Además, podemos ver que las células tumorales son capaces de regular la expresión de estos genes, y esto sugiere la posibilidad de que las células tumorales desempeñen el papel de células presentadoras de antígenos, interactuando con los linfocitos T y condicionando la respuesta inmunitaria, tanto activándola como suprimiéndola.

En conclusión, estos hallazgos corroboran la implicación que tiene CD44 en la progresión y mantenimiento tumoral. Se destaca su participación en la regulación del sistema inmune. Por un lado, se observa que CD44 ejerce una ligera regulación del ligando inhibidor del punto de control inmunitario PD-L1, aumentando su expresión tanto transcripcional como proteica. Como ya se ha mencionado previamente, se trata de una proteína que se une a un receptor inhibitorio de las células T (PD1), lo que conduce a la inhibición de la respuesta inmune [5]. Esto permite que el tumor, al sobre expresar este ligando, sea capaz de evadir el sistema inmune. Gracias a los avances en la inmunoterapia, se ha permitido abordar esta capacidad del tumor de eludir el sistema inmune. Por otro lado, CD44 también parece estar asociada con la supresión de la maquinaria de presentación antigénica. Por último, la regulación de la maquinaria de presentación en células plantea la posibilidad de que estas células actúen como una célula presentadora de antígenos. De esta manera, las células tumorales pueden modular el sistema inmune de manera favorable para su propio beneficio y continuar con su progresión.

Por ello, como investigación futura, se plantea continuar con esta investigación en diferentes líneas para entender de qué manera CD44 modula la respuesta inmune y afecta a vía de señalización activada por IFN $\gamma$ , y ver la posible relación que hay entre CD44 y PD-L1. Así pues, continuar con esta investigación en modelos animales podría confirmar esta relación, además de describir si una alta expresión de CD44 corresponde a una mayor sensibilidad al inhibidor de PD1/PD-L1. Si se confirmase, en un futuro se podría plantear el uso de CD44 como biomarcador de sensibilidad a inmunoterapia en pacientes con CPCNP, además de una posible diana cuya inhibición podría incrementar la eficacia del bloqueo del eje PD-1.

## Bibliografía

- [1] M. B. Schabath and M. L. Cote, "Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer," *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 28, no. 10, pp. 1563–1579, Oct. 2019, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.
- [2] R. Nooreldeen and H. Bach, "Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 16, p. 8661, Aug. 2021, doi: 10.3390/ijms22168661.

- [3] D. B. Doroshow *et al.*, “Immunotherapy in Non–Small Cell Lung Cancer: Facts and Hopes,” *Clinical Cancer Research*, vol. 25, no. 15, pp. 4592–4602, Aug. 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1538.
- [4] M. D’Arcangelo *et al.*, “Programmed death ligand 1 expression in early stage, resectable non-small cell lung cancer,” *Oncotarget*, vol. 10, no. 5, pp. 561–572, Jan. 2019, doi: 10.18632/oncotarget.26529.
- [5] G. J. Freeman *et al.*, “Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 7, pp. 1027–1034, Oct. 2000, doi: 10.1084/jem.192.7.1027.
- [6] J. J. Albuquerque-Bejar *et al.*, “MYC activation impairs cell-intrinsic IFN $\gamma$  signaling and confers resistance to anti-PD1/PD-L1 therapy in lung cancer,” *Cell Rep Med*, vol. 4, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101006.
- [7] M. K. Moutafi *et al.*, “Spatially resolved proteomic profiling identifies tumor cell CD44 as a biomarker associated with sensitivity to PD-1 axis blockade in advanced non-small-cell lung cancer,” *J Immunother Cancer*, vol. 10, no. 8, p. e004757, Aug. 2022, doi: 10.1136/jitc-2022-004757.
- [8] N. Fujita and N. Yaegashi, “Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues: possible implication of reduced expression of CD44 in lymph-vascular space involvement of cancer cells,” *Cancer Res*, pp. 3922–3928, 1994.
- [9] C. Chen, S. Zhao, A. Krnad, and J. W. Freeman, “The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications,” *J Hematol Oncol*, vol. 11, no. 1, p. 64, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13045-018-0605-5.
- [10] M. Zöller, “CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?,” *Nat Rev Cancer*, vol. 11, no. 4, pp. 254–267, Apr. 2011, doi: 10.1038/nrc3023.
- [11] H. Ponta, L. Sherman, and P. A. Herrlich, “CD44: From adhesion molecules to signalling regulators,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 4, no. 1, pp. 33–45, Jan. 2003, doi: 10.1038/nrm1004.
- [12] R. L. Brown *et al.*, “CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 121, no. 3, pp. 1064–1074, Mar. 2011, doi: 10.1172/JCI44540.
- [13] K. Mima *et al.*, “CD44s Regulates the TGF- $\beta$ -Mediated Mesenchymal Phenotype and Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma,” *Cancer Res*, vol. 72, no. 13, pp. 3414–3423, Jul. 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0299.
- [14] M. Mishra, V. Chandavarkar, R. Sharma, and D. Bhargava, “Structure, function and role of CD44 in neoplasia,” *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, vol. 23, no. 2, p. 267, 2019, doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_246\_18.
- [15] M. Hassn Mesrati, S. E. Syafruddin, M. A. Mohtar, and A. Syahir, “CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 12, p. 1850, Dec. 2021, doi: 10.3390/biom11121850.
- [16] Y. He *et al.*, “CD44 is overexpressed and correlated with tumor progression in gallbladder cancer,” *Cancer Manag Res*, vol. Volume 10, pp. 3857–3865, Sep. 2018, doi: 10.2147/CMAR.S175681.
- [17] Y. Lee *et al.*, “CD44+ Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Suppress T-Cell-Mediated Immunity by Selective Constitutive and Inducible Expression of PD-L1,” *Clinical Cancer Research*, vol. 22, no. 14, pp. 3571–3581, Jul. 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2665.
- [18] T. Kong *et al.*, “CD44 Promotes PD-L1 Expression and Its Tumor-Intrinsic Function in Breast and Lung Cancers,” *Cancer Res*, vol. 80, no. 3, pp. 444–457, Feb. 2020, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1108.



## Material complementario

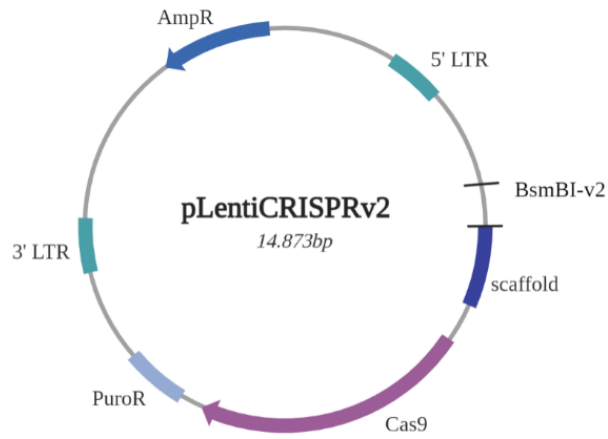


Figura 1S: Plásmido pLentiCRISPRv2

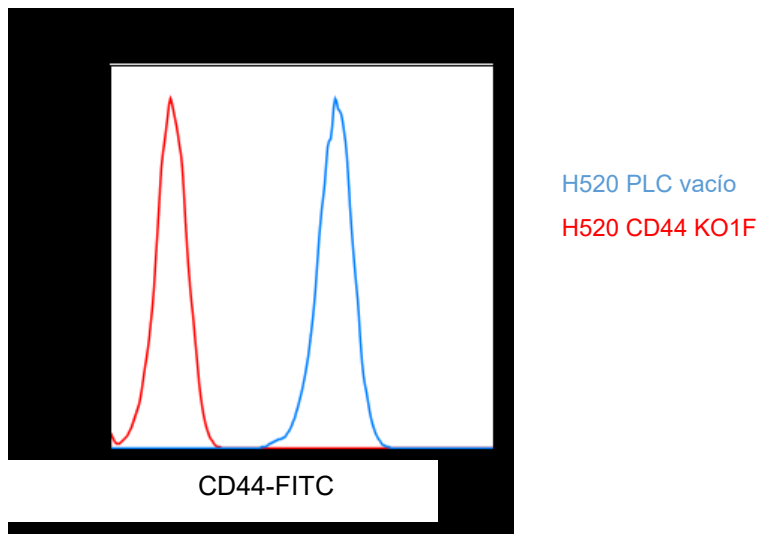


Figura 2S.- Histograma que representa la expresión proteica de CD44 en los dos tipos celulares, H520 PLC y H520 CD44 KO1F, mediante citometría de flujo.