Estudio de CD44 como un posible nuevo biomarcador indicativo de sensibilidad al bloqueo del eje PD-1 en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) avanzado.

Ainhoa Botella Cayuelas[1, 2, a], Magdalena Abraham Molero[2], Jon Zugazagoitia Fraile[2, 3]

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. ainhoabotellacayuelas@gmail.com

Palabras clave: CD44; CPCNP; biomarcador; PD-1; inmunoterapia

Resumen

CD44 es una glicoproteína de superficie expresada en diversos tipos de tumores, incluido el CPCNP. Esta proteína aporta ventajas en la progresión tumoral, participando en procesos como la transición epitelio-mesénquima (EMT) y, como biomarcador, su expresión ha sido relacionada en la mayoría de casos con un peor pronóstico. Sin embargo, tras los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas por Moutafi, Molero et al, en este estudio se han iniciado los experimentos pertinentes para vislumbrar los mecanismos moleculares que causan sensibilidad a la inhibición del eje PD-1 en CPCNP. A través de RT-PCR se ha identificado la isoforma CD44s en cinco líneas celulares de cáncer de pulmón murino (UNCSCC679, UNCSCC680, KLN205, Lacun2 y Lacun3). Además, con el diseño de cuatro sgRNA y mediante la técnica de CRISPR/Cas9 se han conseguido crear tres líneas celulares knock-out para CD44 (UNCSCC679, KLN205 y Lacun3) con el fin de inducir tumores en ratones inmunocompetentes para evaluar los efectos de la inmunoterapia anti-PD1. Los hallazgos de este trabajo son imprescindibles para el desarrollo de modelos murinos que ayuden a conocer el comportamiento de tumores de CPCNP y el descubrimiento de una terapia eficaz contra ellos.

Cita: Botella Cayuelas, Ainhoa; Abraham Molero, Magdalena; Zugazagoitia Fraile, Jon (2022) Estudio de CD44 como un posible nuevo biomarcador indicativo de sensibilidad al bloqueo del eje PD-1 en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) avanzado. dianas 11 (2): e202209fa02. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202209fa02 http://www3.uah.es/dianas?e202209fa02. URI http://hdl.handle.net/10017/15181

Copyright: © Botella-Cayuelas A, 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 segundo tipo de cáncer más frecuente y la primera causa de muerte a nivel mundial, siendo su prevalencia del 18% [1]. Se clasifica en cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CPCNP es el más común y se divide a su vez en tres subtipos: carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes y adenocarcinoma [2].

La progresión en los pacientes tratados con quimioterápicos en muchos casos es inevitable, pero gracias a la caracterización molecular de este tipo de tumores en los últimos años se han conseguido grandes avances en el tratamiento del CPCNP [3,4]. En concreto, la capacidad que tiene el sistema inmune para detectar células que no son propias del organismo ha hecho que el desarrollo de una terapia que potencie la inmunidad natural para combatir el tumor, haya sido el principal objeto de estudio. No obstante, las células tumorales son capaces de desarrollar mecanismos de evasión del sistema inmune que permitan el crecimiento y la supervivencia tumoral [5]. Algunos de estos mecanismos incluyen la expresión de ligandos de puntos de control inmunitarios, entre los que destaca el eje PD-1/PD-L1 [6]. Por este motivo, el descubrimiento de inhibidores del punto de control inmunitario (ICI) dirigidos a PD-1/PD-L1 ha mejorado la supervivencia de los pacientes, provocando cambios relevantes en el tratamiento del CPCNP avanzado [7,8]. Sin embargo, muchos pacientes no logran una respuesta duradera a estas terapias [7]. La identificación de biomarcadores que predigan la eficacia de la inmunoterapia ayudaría a entender los mecanismos de sensibilidad y resistencia a los inhibidores del eje PD-1 [9].

CD44 es una glicoproteína de tipo transmembrana codificada por 20 exones, los cuales pueden dar lugar a una gran variedad de isoformas. Los exones 1–5 y 16–20 correspondientes a los dominios N-terminal y C-terminal son compartidos por todos los miembros de la familia CD44 y dan lugar a la forma estándar de CD44 (CD44s), mientras que los exones 6–15 pueden sufrir splicing alternativo y ensamblarse con los exones contenidos en CD44s, dando lugar a las isoformas variantes de CD44 (CD44v). En humanos, la estructura del gen de CD44 carece del exón 6, dando lugar a la variante 1 de CD44 (CD44v1) [10]. Esta

glicoproteína se expresa en muchas de las células del cuerpo humano actuando como receptor de diferentes ligandos de la matriz extracelular (MEC), entre los que destaca el glucosaminoglicano de hialuronano (HA) [11,12]. Así pues, la sobreexpresión de CD44 en algunos tipos de células tumorales aporta ventajas en la progresión tumoral [10], participando en procesos como la transición epitelio-mesénquima (EMT) [13-15], la desdiferenciación [16], la migración [17] y la resistencia a la apoptosis [18]. CD44 también ha sido implicado en la supresión de la respuesta inmune antitumoral a través de diversos mecanismos. Por ejemplo, se ha descrito que CD44 es modulador de PD-L1, contribuyendo así a la supresión de células T antitumorales [19,20]. Además, se ha demostrado que las células iniciadoras de tumores que expresan CD44 pueden sobreexpresar CD80 y suprimir así una respuesta T antitumoral por mecanismos que implican a CTLA4 [21]. Las últimas investigaciones sugieren que algunas de las isoformas de CD44 podrían ser prometedores biomarcadores pronósticos y/o dianas terapéuticas de muchos tipos de cáncer [22]. Aunque se ha avanzado en el conocimiento sobre la estructura y las funciones de CD44 y sus diversas isoformas, sigue siendo desconocida la asociación entre el nivel de expresión y la respuesta al tratamiento con inmunoterapia.

Estudios realizados por *Moutafi, Molero et al* revelaron a través de la tecnología GeoMx™ Digital Spatial Profiling (DSP) que altos niveles de CD44 estaban asociados a una mayor supervivencia. Estos hallazgos fueron validados en una cohorte independiente de pacientes tratados con inmunoterapia en el Hospital Universitario 12 de Octubre, donde se verificó que CD44 podría ser un biomarcador de sensibilidad del CPCNP avanzado al bloqueo del eje PD-1. Del mismo modo, se apreció un microambiente inmune diferente en el compartimento tumoral, caracterizado por la abundante expresión de PD-L1, TIM3, CD40 y ICOS; y una asociación lineal significativa de CD80 [23]. En base a estos resultados se ha diseñado este trabajo, en el que se ha analizado la expresión diferencial de las isoformas de CD44 en la superficie de distintas líneas celulares de ratón de CPCNP y los efectos de su inactivación mediante CRISPR/Cas9.

Métodos

Cultivos celulares

Se utilizaron cinco líneas celulares de cáncer de pulmón murino. Las células KLN205 crecieron en medio MEM (*Sigma*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *Sigma*), 1% de penicilina/estreptomicina (*Lonza*) y 1% de aminoácidos no esenciales (*Sigma*) a 37ºC en condiciones de humedad de 5% CO_2. Las células Lacun2, Lacun3, UNCSCC679 y UNCSCC680 crecieron en medio RPMI 1640 GlutaMAX (*Gbico*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *Sigma*) y 1% de penicilina/estreptomicina (*Lonza*) a 37ºC en condiciones de humedad de 5% de CO_2.

Además, se emplearon células HEK293 como células de empaquetamiento lentiviral, y fueron cultivadas en medio DMEM (*Sigma*) complementado con suero fetal bovino (FBS, *Sigma*) al 10% y antibióticos de penicilina/estreptomicina al 1% (*Lonza*). Los cultivos se mantuvieron a 37ºC en condiciones de humedad de 5% de CO_2.

Extracción de ARN total

La purificación del ARN total de las células Lacun2, Lacun3, UNCSCC679, UNCSCC680 y KLN205 se llevó a cabo utilizando el *RNeasy Mini Kit* (*QIAGEN*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total extraído fue resuspendido en 30µl de agua libre de RNasas. La concentración del ARN extraído de cada muestra se determinó por espectrofotometría a 260nm con el Nanodrop D100 (*Thermo Fisher scientific*), y la calidad de la extracción fue comprobada en un gel de agarosa al 1% en TAE.

RT-PCR

El ADNc de todas las líneas celulares se generó por transcripción reversa a través del *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*QIAGEN*). El ADNc fue sintetizado a partir de 10µl de ARN total por muestra en un volumen total de 20µl que contenía 2X RT Master Mix (RT *buffer,* RT *Random Primers*, dNTP *Mix*, inhibidor de RNasas, agua libre de nucleasas y *MultiScribe™ Reverse Transcriptase; QIAGEN*). La mezcla fue incubada en el termociclador a 25ºC por 10 minutos, a 37ºC por 120 minutos y a 85ºC por 5 minutos.

Para la reacción de PCR del ADNc se diseñaron tres parejas de primers diferentes a partir de la secuencia de ADN de CD44 de ratón (Tabla 1). Los oligonucleótidos fueron dirigidos a amplificar la secuencia delimitada entre los exones 5 y 6. Todos ellos fueron predichos en la página web *Primer3* (*https://primer3.ut.ee/*). Los resultados de las tres parejas de primers predichas se verificaron la página web *Primer Blast* (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/*).

Gen	Nombre del primer	Secuencia del oligonucleótido (5' → 3')	Tm
CD44	CD44 1 For	[6FAM]CCGTGATGGTACTCGCTACA	63.7
	CD44 1 Rev	CCCTGGAGTCCTTGGATGAG	65.9
	CD44 2 For	[6FAM]CTCCACCATCGAGAAGAGCA	65.6
	CD44 2 Rev	GATCCATGAGTCACAGTGCG	64.6
	CD44 3 For	[6FAM]AGCAGCGGCTCCACCATCGAGA	76.3
	CD44 3 Rev	TCGGATCCATGAGTCACAGTG	66.3
β2-microglubulina	β2-MG For	TGGTGCTTGTCTACTGACC	64.2
	β2-MG Rev	TCACATGTCTCGATCCCAGT	63.3

Tabla 1.- Oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR. Se muestra el nombre de los primers utilizados, su secuencia y la temperatura optima de *melting* para la reacción.

5µl del ADNc de cada muestra fueron amplificados mediante PCR en un volumen final de 50µl. La mezcla se sometió en el termociclador a 30 ciclos de 94ºC por 45 segundos, 63.5ºC (primer 1 y 2) o 60ºC (primer 3) por 30 segundos y 72ºC por 135 segundos, seguido de una extensión final de 72ºC por 10 minutos. Los primers utilizados se enumeran en la Tabla 1. Todas las reacciones de amplificación se hicieron en 10X PCR *buffer* (sin Mg), 1.5mM de $MgCl_2$, 0.2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer para amplificar CD44 o β2-microglobulina (β2M) como control positivo, y 5U/µL de Taq ADN polimerasa (*Thermo Fisher scientific*). La ausencia de amplificaciones inespecíficas se verificó mediante RT-PCR de controles negativos (todos los reactivos excepto ADNc). La integridad de todos los fragmentos amplificados fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE, teñido con *DNA-Dye Non Tox* (*AppliChem*). El peso molecular fue determinado por comparación con un marcador de pesos moleculares para ADN, *1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).* El tamaño teórico de los productos de PCR se muestra en la Figura 1.

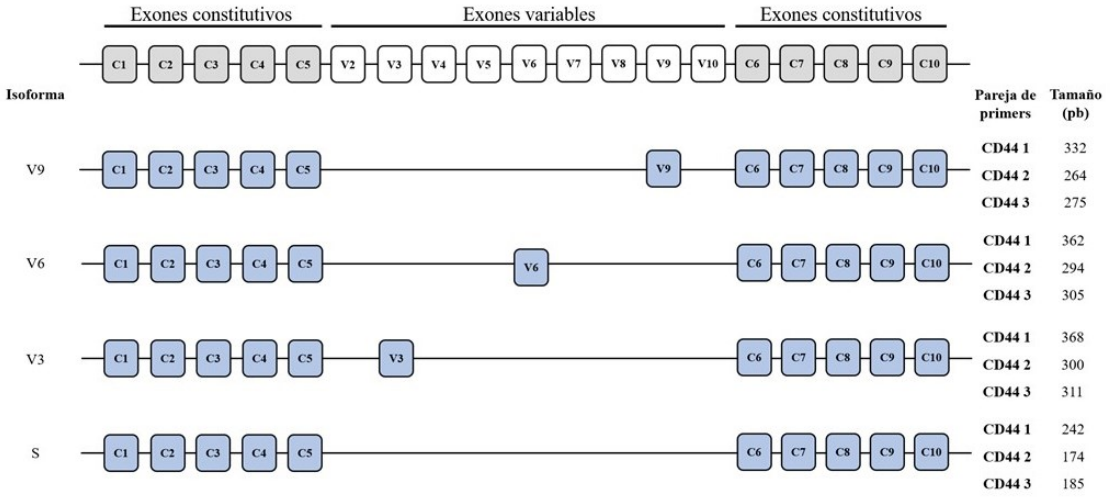


Figura 1.- Tamaño teórico (pb) de las isoformas V9, V6, V3 y S de CD44 para cada pareja de primers. Adaptado de *Naor et al* 1997, *Schmitt et al* 2015, *Chen et al* 2018.

Electroforesis capilar

Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis capilar a través del analizador genético ABI PRISM® 3130XL (*Applied Biosystems*) para confirmar el tamaño de las isoformas detectadas. Los datos obtenidos se analizaron con el software *Peak Scanner*.

Diseño del ARN guía pequeño (sgRNA)

Para diseñar el sgRNA con la secuencia de interés de CD44 se empleó el sitio web *Integrated DNA Technologies (IDT).* Teniendo en cuenta los sgRNA con mayor número de probabilidad *On-Target Efficacy Score* y el menor número de *Combined-Rank,* finalmente se obtuvo la secuencia de 4 sgRNA dirigidos al CD44 murino. La secuencia de la pareja de oligonucleótidos (*primer y reverse*) correspondiente para cada sgRNA se diseñó con extremos cohesivos para la enzima de restricción BsmBI-v2 (*Sigma*). La secuencia de los sgRNA empleados se muestra en la Tabla 2.

Nombre del sgRNA	Secuencia
CD44 sgRNA_1	TATGGTAACCGGTCCATCGA
CD44 sgRNA_2	CTACGCAGGTGTATTCCATG
CD44 sgRNA_3	AAGGAAATGTGGTAATTCCG
CD44 sgRNA_4	CATGGAATACACCTGCGTAG

Tabla 2.- Secuencias de los cuatro sgRNA utilizados dirigidos a CD44 murino.

Clonaje de los oligonucleótidos en pLentiCRISPR

1µg/µl del plásmido LentiCRISPRv2 (*Addgene nº52961; http://www.addgene.org/52961/*) fueron digeridos con 3µl de la enzima de restricción BsmBI-v2 (*New England BioLabs*) y posteriormente desfosforilados con fosfatasa. Los componentes del plásmido utilizado se muestran en a Figura 2. La pareja de oligonucleótidos de cada sgRNA se sometió a una reacción de fosforilación y anillamiento en el termociclador a 37ºC durante 30 minutos, 95ºC durante 5 minutos y un descenso de 5ºC/minuto hasta 25ºC durante 14 minutos.

Tras la reacción de ligación del pLentiCRISPR con cada pareja de oligonucleótidos, se llevó a cabo la transformación en células *E.coli* y las bacterias fueron sembradas en medio LB-agar con el antibiótico de ampicilina. Se seleccionaron 4 clones de cada plásmido transformado y los plásmidos se purificaron mediante *QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)* y *HiSpeed Plasmid Kit* (*QIAGEN*).

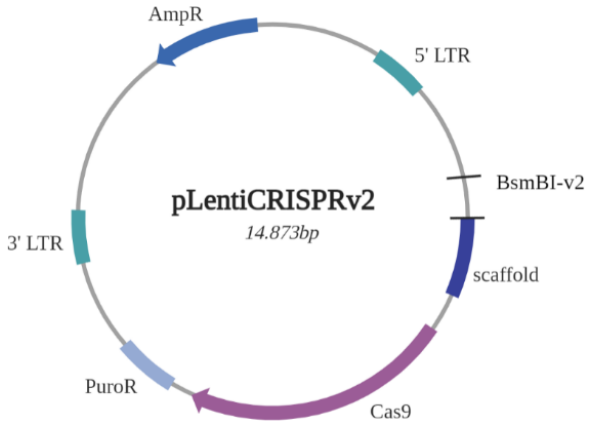


Figura 2.- Estructura del plásmido LentiCRISPRv2. El plásmido contiene las secuencias diana de la enzima de restricción BsmBI para la inserción del sgRNA dirigido al CD44 murino, así como Cas9 y secuencias que codifican para los antibióticos de selección ampicilina y puromicina.

Para confirmar la correcta ligación de los plásmidos pLentiCRISPR con su correspondiente sgRNA, se digirieron con la enzima de restricción BsmBI-v2 durante 2 horas a 55ºC y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE. Se utilizó un plásmido pLentiCRISPR sin inserto como control. El peso molecular fue determinado por comparación con un marcador de pesos moleculares para ADN, *1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).* Además, se verificó la secuencia de los plásmidos por secuenciación Sanger.

Transfección e infección con vectores lentivirales

Se seleccionó uno de los plásmidos pLentiCRISPR clonados con cada sgRNA, y se transfectaron junto con los plásmidos psPAX (*Addgene* nº12260*; https://www.addgene.org/12260/*) y pMD2 (*Addgene nº 12259; https://www.addgene.org/12259/)* en células HEK293T para la producción de lentivirus.

La transducción de los cuatro vectores lentivirales, así como la del vector vacío fue realizada en células UNCSCC679, Lacun3 y KLN205. Se incluyó un control de negativo (sin transducir) de cada línea celular. Estas células se sembraron previamente y se permitió que crecieran hasta una confluencia del 60% (aproximadamente 3×10^6 células/pocillo). Para aumentar la eficacia de la infección se utilizó polibreno (*Sigma*) a una concentración de 10µg/mL. Las células infectadas se incubaron a 37˚C al 5 % en CO_2. Tras 24h de la infección, se reemplazó el medio de la transducción por el medio de cultivo de cada línea celular y se incubaron durante 6 días.

La confirmación de la expresión del plásmido pLentiCRISPR se realizó mediante la adición del antibiótico de puromicina a una concentración de 8µg/mL para las líneas UNCSCC679 y Lacun3, y 10µg/mL para la línea KLN205. Como control negativo de la selección se tuvieron en cuenta las células que no fueron transfectadas.

Citometría de flujo

Para el análisis de CD44 las células UNCSCC679, Lacun3 y KLN205 se separaron, centrifugaron, lavaron y tiñeron durante 30 minutos con el anticuerpo anti-CD44 (human/mouse) marcado con FITC (clon: IM7, *eBioscience*) diluido 1:200 en PBS + 1% BSA. Las muestras fueron analizadas en citómetro FACSCalibur (*Becton Dickinson*), empleando el software FlowJo (*Tree Star*).

Resultados

Concentración e integridad del ARN de las líneas celulares

En la cuantificación del ARN extraído se realizó la lectura de densidad óptica a 260nm y 280nm en el espectrofotómetro para medir ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente. La integridad del ARN de las muestras se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. Las concentraciones variaron desde 35,4 a 143,9ng/µl. La razón de pureza optima varió entre 2,06 y 2,09. En las 5 líneas celulares se observó la expresión de ARNr citoplasmático 28s y 18s, y ARNr de orgánulos 16s, con pesos moleculares de 4,7kb, 1,9kb y 1,4kb, respectivamente. No se observó degradación total de ninguna de las muestras de ARN separadas por electroforesis. La banda indefinida, correspondiente a la subunidad menor del ARNr en la muestra UNCSCC670, denota degradación parcial. Los resultados se muestran en la Figura 3.

A

Línea celular	Ratio 260/280	Concentración RNA (ng/µl)
UNCSCC680	2,06	77ng/µl
UNCSCC679	2,07	91,1ng/µl
KLN205	2,08	35,4ng/µl
Lacun2	2,09	143,9ng/µl
Lacun3	2,07	55,2ng/µl

B

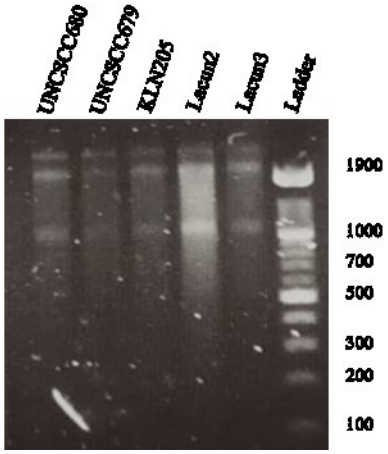


Figura 3.- (A) Concentración de ARN de cada muestra. (B) Electroforesis del ARN de las muestras en gel de agarosa. Las dos primeras bandas intensas corresponden a las subunidades mayor y menor del ARNr y su presencia indica un ARN óptimo.

Expresión de las isoformas de CD44 en líneas celulares

Con el fin de identificar qué isoformas de CD44 se expresan en las líneas celulares de cáncer de pulmón murino mencionadas, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR a partir del ARN extraído y convertido a ADNc. Se diseñaron 3 parejas de primers diferentes dirigidas a las regiones de los exones 5 y 6 para amplificar las distintas isoformas de CD44 que pudieran expresar las líneas celulares. Con las tres parejas de primers fue detectada la isoforma CD44s en las 5 líneas celulares, tal y como se muestra en la Figura 4.

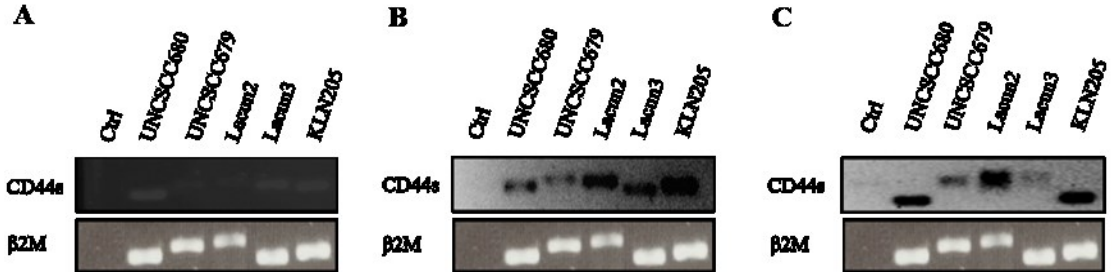


Figura 4.- Identificación de la isoforma CD44s en la electroforesis en gel de agarosa de la RT-PCR realizada con la pareja de primers 1 (A), primers 2 (B) y primers 3 (C).

La electroforesis capilar, como segundo método de análisis de las isoformas de CD44, permitió conocer el tamaño (pb) de las isoformas de CD44s detectadas en cada condición (Figura 5). En todos los casos se detectó la isoforma de CD44s, variando en 2pb respecto al tamaño teórico predicho (Figura 1). Para la RT-PCR realizada con la pareja de primers 1 se halló la isoforma CD44s en las líneas celulares UNCSCC679 y KLN205, con un tamaño de 240 pb. Tanto para la RT-PCR de la pareja de primers 2 y 3 la isoforma de CD44s se identificó en todas las líneas celulares, teniendo un tamaño de 172pb y 183pb, respectivamente.

A

UNCSCC680	UNCSCC679	Lacun2	Lacun3	KLN205
240pb	-	-	-	240pb

B

UNCSCC680	UNCSCC679	Lacun2	Lacun3	KLN205
172pb	172pb	172pb	172pb	172pb

C

UNCSCC680	UNCSCC679	Lacun2	Lacun3	KLN205
183pb	183pb	183pb	183pb	183pb

Figura 5.- Número de pares de bases obtenidas de la isoforma CD44s por electroforesis capilar para la RT-PCR de la pareja de primers 1(A), primers 2 (B) y primers 3 (C).

Generación de CD44 *knock-out* en las líneas celulares UNCSCC679, KLN205 y Lacun3

Los 4 sgRNA diseñados contra el CD44 murino se insertaron en plásmidos pLentiCRISPR y tras su transformación en bacterias *E.coli* se obtuvieron 4 clones. En la Figura 6 se observan los resultados de la digestión de los plásmidos con la enzima de restricción BsmBI-v2 para 4 clones del plásmido pLentiCRISPR con el inserto de la pareja de oligonucleótidos 1 (pLentiCRISPR_oligos1) y 3 (pLentiCRISPR_oligos3), 3 clones del plásmido pLentiCRISPR con el inserto de la pareja de oligonucleótidos 2 (pLentiCRISPR_oligos2), y 1 clon del plásmido pLentiCRISPR con el inserto de la pareja de oligonucleótidos 4 (pLentiCRISPR_oligos4). La ausencia de una banda de 2Kb indica que el sgRNA correspondiente se ha insertado correctamente en el plásmido pLentiCRISPR y ha eliminado los sitios de corte de la enzima de restricción BsmBI.

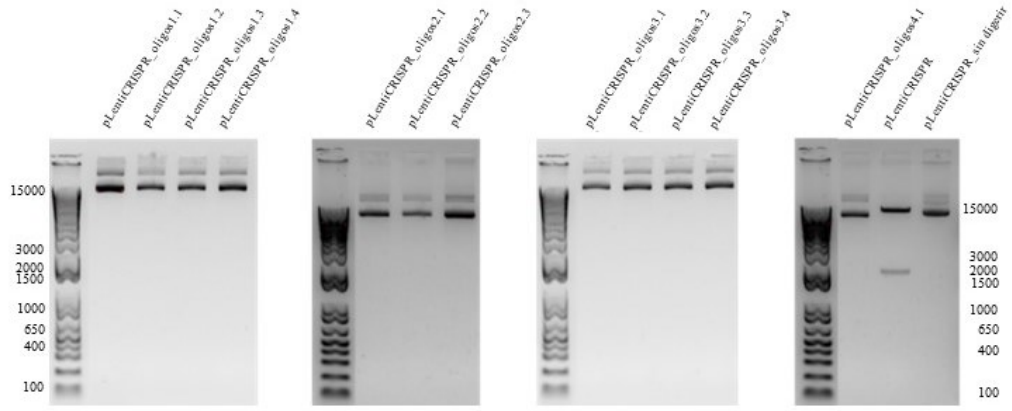


Figura 6.- Resultados de la digestión de los plásmidos pLentiCRISPR_oligos1, pLentiCRISPR_oligos2, pLentiCRISPR_oligos3 y pLentiCRISPR_oligos4 con BsmBI-v2.

Un clon de cada pLentiCRISPR generado fue seleccionado para la producción de lentivirus en células HEK293T y su infección en las líneas celulares UNCSCC679, KLN205 y Lacun3. La infección lentiviral fue realizada con 16 virus por célula, según el protocolo optimizado en el laboratorio. En la Figura 7 se puede apreciar las células transfectadas que sobrevivieron a la selección con puromicina y, por tanto, expresaron el plásmido pLentiCRISPR.

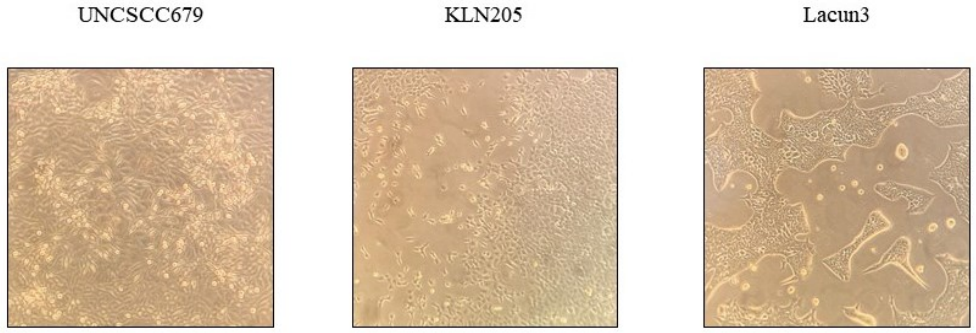


Figura 7.- Células UNCSCC679, KLN205 y Lacun3 transfectadas con el plásmido pLentiCRISPR.

Con el fin de identificar si las células que sobrevivieron a la selección habían perdido la expresión de CD44 en la membrana, fueron analizadas por citometría de flujo para examinar la proteína de superficie CD44. Las líneas celulares UNCSCC679, KLN205 y Lacun3 transfectadas con los plásmidos pLentiCRISPR_oligos1, pLentiCRISPR_oligos2, pLentiCRISPR_oligos3 y pLentiCRISPR_oligos4 mostraron una significativa disminución de CD44 en la superficie celular respecto a las células sin transfectar (Figura complementaria 2). El plásmido pLentiCRISPR_oligos2 fue el que mostró menor expresión de CD44 en las tres líneas celulares utilizadas. En la Figura 8 se muestra el histograma representativo de ello.

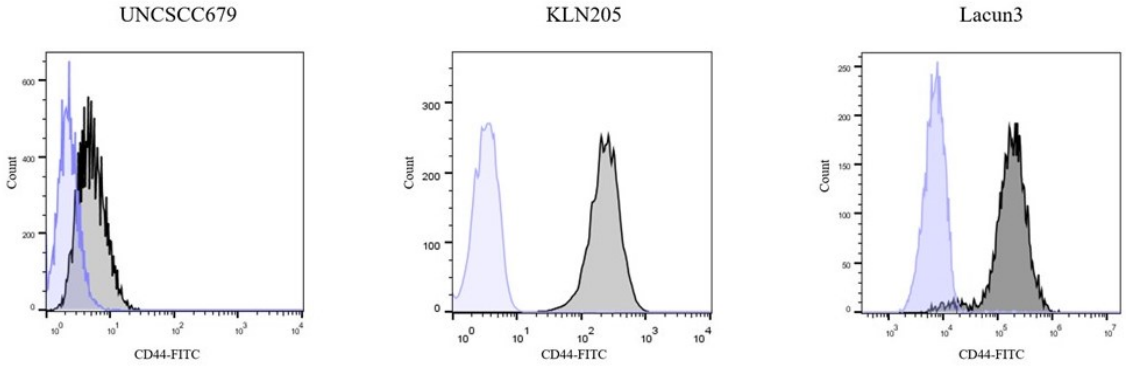


Figura 8.- Análisis de la expresión de pLentiCRISPR_oligos2 por citometría de flujo de las líneas celulares UNCSCC679 (A), KLN205 (B) y Lacun3 (C). La línea negra del histograma representa la expresión de CD44 en el vector vacío y la línea morada la expresión del *knockout* de CD44.

Discusión

CD44 es un marcador de superficie sobreexpresado en células tumorales de tipo epitelial con un fenotipo casi mesenquimal y, por tanto, necesario para la EMT que tiene lugar en el inicio del proceso tumoral [13, 16, 18]. Esta proteína también ha sido localizada en células madre de diversos tumores [24-26]. La sobreexpresión de CD44 en células tumorales se relaciona con un peor pronóstico de evolución [10, 27-30]. Sin embargo, hasta ahora no había sido relacionada con mejoras clínicas tras el bloqueo del eje PD-1.

En este estudio se han continuado las investigaciones realizadas por *Moutafi, Molero et al* respecto a la validación de CD44 como un nuevo biomarcador asociado a sensibilidad del bloqueo del eje PD-1 en CPCNP. Utilizando la tecnología DSP se observó en una cohorte compuesta por pacientes que habían recibido inmunoterapia, que una mayor expresión de CD44 se relacionaba con una mejor supervivencia o progresión libre de enfermedad [23]. El papel que desempeña CD44 en este conjunto de pacientes tratados con inmunoterapia es desconocido, habiendo trabajos que confirman que puede tener una relación directa con PD-L1 [28] y con la supresión de la respuesta T antitumoral mediada por CD80/CTLA4 [21].

Por tales hallazgos surge la necesidad de buscar los mecanismos moleculares involucrados en la sensibilidad a la inmunoterapia anti-PD1 generada en pacientes con sobreexpresión de CD44 en tumores de CPCNP. En el curso de nuestro estudio se ha identificado mediante RT-PCR la expresión de la isoforma CD44s en algunas de las líneas celulares de cáncer de pulmón más utilizadas en investigación (UNCSCC679, UNSCC680, Lacun2, Lacun3 y KLN205). Asimismo, a través del diseño de sgRNA y empleando la técnica de CRISPR/Cas9 se han desarrollado tres modelos celulares *knock-out* para CD44 (UNCSCC679, Lacun3 y KLN205).

Desde el punto de vista clínico, conocer el comportamiento de tumores de CPCNP con sobreexpresión de CD44 sería de gran utilidad para poder proporcionar a este subgrupo de pacientes un tratamiento de mayor eficacia contra el tumor. La posibilidad de utilizar a CD44 como un biomarcador alternativo puede ser de interés en tumores donde PD-L1 da información predictiva limitada. Incluso, si se confirma con modelos animales que una mayor expresión de CD44 se corresponde a una mayor sensibilidad a anti-PD1, se podrían utilizar ambos como biomarcadores complementarios. Con este trabajo se ha conseguido definir y desarrollar tres líneas celulares de cáncer de pulmón murino *knock-out* para CD44, que se implantarán en ratones inmunocompetentes para generar modelos de ratón. De este modo, tras el tratamiento con inmunoterapia anti-PD1 se podrá estudiar el comportamiento y características de estos tumores. Las líneas celulares generadas en este estudio serán indispensables para el estudio y la validación funcional de CD44 como nuevo mecanismo de sensibilidad al bloqueo del eje PD-1 y potencial nueva diana de inmunoterapia en CPCNP.

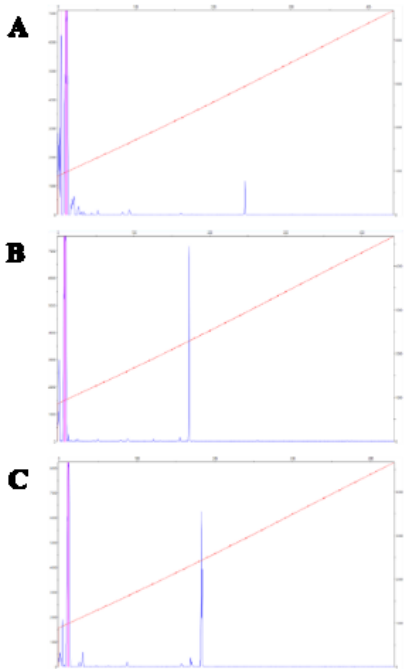
Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. En internet, https://www.who.int/es
2. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I. 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. J Thorac Oncol,10(9):1243–60.
3. Melosky B, Chu Q, Juergens R, Leighl N, McLeod D, Hirsh V. 2016. Pointed progress in second-line advanced non-small-cell lung cancer: The rapidly evolving field of checkpoint inhibition. J Clin Oncol, 34(14):1676–88.
4. Melosky B, Wheatley-Price P, Juergens RA, Sacher A, Leighl NB, Tsao MS, Cheema P, Snow S, Liu G, Card PB, Chu Q. 2021.The rapidly evolving landscape of novel targeted therapies in advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer,160:136–51.
5. Stewart TJ, Abrams SI. 2008. How tumours escape mass destruction. Oncogene,27(45):5894–903.
6. D'Arcangelo M, D'Incecco A, Ligorio C, Damiani S, Puccetti M, Bravaccini S, Terracciano L, Bennati C, Minuti G, Vecchiarelli S, Landi L, Milesi M, Meroni A, Ravaioli S, Tumedei MM, Incarbone M, Cappuzzo F. 2019. Programmed death ligand 1 expression in early stage, resectable non-small cell lung cancer. Oncotarget,10(5):561–72
7. Doroshow DB, Sanmamed MF, Hastings K, Politi K, Rimm DL, Chen L, Melero I, Schalper KA, Herbst RS. 2019. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Facts and hopes. Clin Cancer Res,25(15):4592–602.
8. Grant MJ, Herbst RS, Goldberg SB. 2021. Selecting the optimal immunotherapy regimen in driver-negative metastatic NSCLC. Nat Rev Clin Oncol,18(10):625–44.
9. Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA. 2017. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. Br J Cancer,117(1):1–7.
10. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. 2018. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. J Hematol Oncol,1–23.
11. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. 1990. CD44 Is the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronate. Cell,61(7): 1303-13.
12. Biology C, Morath I, Hartmann TN, Orian-rousseau V. 2016. CD44: More than a mere stem cell marker. Int J Biochem Cell Biol,81:166–73.
13. Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D. 2011. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. J Clin Invest,121(3):1064–74.
14. Pu Zhao M, Xu Y, Wei Y, Oui Q, Chew TL, Kang Y, Cheng C. 2016. The CD44s splice isoform is a central mediator for invadopodia activity. J Cell Sci,129(7):1355-65.
15. Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Tamada M, Nagano O, Saya H, Baba H. 2012. CD44s Regulates the TGF- b – Mediated Mesenchymal Phenotype and Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Cancer Res,72(13):3414–23.
16. Dongre A, Weinberg RA. 2019. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. Nat Rev Mol Cell Biol,20(2):69-84.
17. Wang YY, Vadhan A, Chen PH, Lee YL, Chao CY, Cheng KH, Chang YC, Hu SCS, Yuan SSF. 2021. CD44 Promotes Lung Cancer Cell Metastasis through ERK–ZEB1 Signaling. Cancers (Basel),13(16):4057.
18. Zöller M. 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? Nat Publ Gr,11(4):254–67.
19. Lee Y, Shin JH, Longmire M, Wang H, Kohrt HE, Chang HY, Sunwoo JB. 2016. CD44+ Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Suppress T-Cell–Mediated Immunity by Selective Constitutive and Inducible Expression of PD-L1. Clin Cancer Res,22(14):3571-81.
20. Kong T, Ahn R, Yang K, Zhu X, Fu Z, Morin G, Bramley R, Cliffe NC, Xue Y, Kuasne H, Li Q, Jung S, Gonzalez AV, Camilleri-Broet S, Guiot MC, Park M, Ursini-Siegel J, Huang S. 2020.

CD44 Promotes PD-L1 Expression and Its Tumor-Intrinsic Function in Breast and Lung Cancers. Cancer Res, 80(3):444–57.

21. Miao Y, Yang H, Levorse J, Yuan S, Polak L, Sribour M, Singh B, Rosenblum M, Fuchs E. 2019. Adaptative Immune Resistance Emerges from Tumor-Initiating Stem Cells. Cell,177(5):1172-1186.
22. Mesrati MH, Syafruddin SE, Mohtar MA, Syahir A. 2021. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. Biomolecules, 11(12):1850.
23. Myrto Moutafi, Magdalena Molero, Sandra Martinez-Morilla, Javier Baena, Ioannis Vathiotis, Niki Gavrielatou, Laura Castro-Labrador, Gorka Ruiz de Garibay, Vera Adradas, Daniel Orive, Karmele Valencia A. 2021. Spatially resolved proteomic profiling identifies tumor cell CD44 as a novel indicative biomarker of sensitivity to PD-1 axis blockade in advanced non-small cell lung cancer. J Immunother cancer, en revisión
24. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis Mt, Rosen JM, Chang JC. 2009. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. Proc Nat Acad Sci USA,106(33):13820-5.
25. Nishino M, Ozaki M, Hegab AE, Hamamoto J, Kagawa S, Arai D, Yasuda H, Naoki K, Soejima K, Saya H, Betsuyaku T. 2017. Variant CD44 expression is enriching for a cell population with cancer stem cell-like characteristics in human lung adenocarcinoma. J Cancer,8(10):1774-1785.
26. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. Proc Nat Acad Sci USA,104(3).
27. Luo Z, Wu R, Lv L, Li P, Zhang LY, Hao QL, Li W. 2014. Prognostic value of CD44 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. Int J Clin Exp Phatology,7(7):3632–46.
28. Li XP, Zhang XW, Zheng LZ, Guo WJ. 2015. Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. Int J Clin Exp Phatology,8(6):6724–31.
29. Xu H, Tian Y, Yuan X, Liu Y, Wu H, Liu Q, Wu GS, Wu K. 2016. Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. Onco Targets Ther,9:431–44.
30. Hou C, Ishi Y, Motegi H, Okamoto M, Ou Y, Chen J, Yamaguchi S. 2019. Overexpression of CD44 is associated with a poor prognosis in grade II / III gliomas. J Neurooncol,145(2):201-210.

Material suplementario



UNCSCC680	UNCSCC679	Lacun2	Lacun3	KLN205
240pb	-	-	-	240pb

UNCSCC680	UNCSCC679	Lacun2	Lacun3	KLN205
172pb	172pb	172pb	172pb	172pb

UNCSCC680	UNCSCC679	Lacun2	Lacun3	KLN205
183pb	183pb	183pb	183pb	183pb

Figura complementaria 1.- Resultados de la electroforesis capilar.

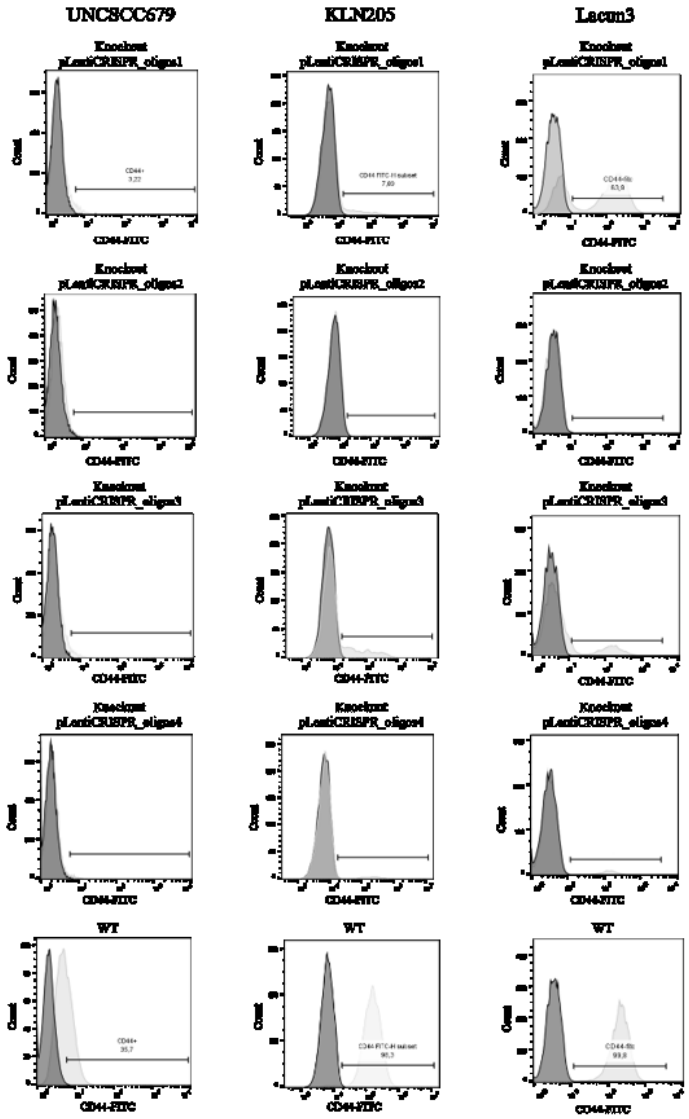


Figura complementaria 2.- Resultados de la citometría para todos los pLentiCRISPR de las líneas celulares UNCSCC670, Lacun3 y KLN205.