



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Procesamiento de los receptores TAM en patología humana y su empleo como biomarcadores

Helena Cristóbal Valero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Doctorado en Biomedicina

**PROCESAMIENTO DE LOS RECEPTORES TAM EN
PATOLOGÍA HUMANA Y SU EMPLEO COMO
BIOMARCADORES**

2022

Helena Cristóbal Valero

Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Doctorado en Biomedicina

PROCESAMIENTO DE LOS RECEPTORES TAM EN PATOLOGÍA HUMANA Y SU EMPLEO COMO BIOMARCADORES

Tesis para optar al título de doctora presentada por

Helena Cristóbal Valero

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC)

Departamento de Muerte y Proliferación Celular

2022

Dr. Pablo García de Frutos

Co-director

Dr. Albert Morales Muñoz

Co-director

Dra. Maria del Carme Caelles Franch

Tutora

Resumen

La familia TAM consta de tres receptores de membrana de tipo tirosina-quinasa: TYRO3, AXL, MERTK. Sus ligandos son *Growth Arrest-Specific 6* (GAS6) y la Proteína S (PROS1). Éstas últimas son proteínas dependientes de vitamina K, que al unirse activan los receptores y desencadenan cascadas de señalización involucradas en procesos inflamatorios, fibróticos, antiapoptóticos y autoinmunes. Su diversidad funcional hace que su investigación tenga interés en diversas patologías caracterizadas por estos eventos.

Múltiples estudios han observado que los niveles, tanto de los receptores como de los ligandos, están alterados en diversas patologías: cáncer colorrectal, cáncer de mama, infecciones víricas, lupus, esteatohepatitis, artritis, entre muchas otras. Nuestros estudios en el cáncer de páncreas y la enfermedad por coronavirus (*Coronavirus disease 2019*, COVID-19), son ejemplos del posible uso de estas proteínas como biomarcadores en suero de pacientes. Representan un avance en clínica, ya que detectarían la patología en sus fases iniciales y darían una orientación del pronóstico del paciente, mediante una técnica rápida, no invasiva y de bajo coste.

En primer lugar, el estudio de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), el tipo de cáncer de páncreas más común, refleja una sobreexpresión inmunohistológica de AXL en muestras de tumores. Asimismo, mediante el estudio con líneas celulares y ratones transgénicos, detectamos que las modificaciones de estas proteínas a nivel de ARN y proteína, se deben a las células tumorales y que aparecen a partir de un estadio concreto de lesiones preneoplásicas. Además, los niveles de sAXL y GAS6 se encuentran aumentados en suero de pacientes, por lo que serían indicativos de la presencia de esta patología en sus fases tempranas.

Estos análisis, comparados con CA19-9, el biomarcador por excelencia de PDAC, muestran a sAXL con una mayor especificidad y sensibilidad, ya que es capaz de discernir mejor entre PDAC y pancreatitis crónica. Esto es importante ya que el cáncer de páncreas es uno de los cánceres más mortíferos dada su detección tardía, lo que supone la imposibilidad de iniciar un tratamiento efectivo. No obstante, dada la heterogeneidad de la expresión de AXL, proponemos el uso de esta proteína junto a otros biomarcadores para un diagnóstico definitivo.

La COVID-19 es una patología causada por la infección de SARS-CoV-2 (acrónimo de *Severe Acute Respiratory Syndrome-2*). En nuestro estudio observamos que los niveles de GAS6 en suero de

pacientes positivos en SARS-CoV-2 en el momento que acudieron a urgencias durante la primera ola de COVID-19, están significativamente más elevados respecto a pacientes negativos en la infección vírica. Además, GAS6 está más aumentado en pacientes que hospitalizan respecto a aquellos que no lo requieren, siendo aún más significativo el aumento en pacientes que finalmente fallecen. Estos resultados, junto a otros estudios que proponen que AXL podría ser un correceptor del virus junto a ACE-2 (por *Angiotensin-converting enzyme 2*), muestran que el sistema GAS6/AXL está activo en las fases iniciales de la infección y puede dar un pronóstico del paciente.

Nuestros resultados van en sintonía con aquellos reportados posteriormente por otros grupos de investigación. El hecho de que el sistema GAS6/TAM sea partícipe en los eventos moleculares iniciales en la patología, refuerza la idea de que el uso de moduladores de este sistema, como el del inhibidor de AXL bemcentinib, podría ayudar a la prevención y/o tratamiento de estas enfermedades. Aun así, se necesitarían más estudios ampliando el número de muestras y empleando reactivos que en su momento no estaban a disposición del laboratorio.

Abstract

TYRO3, AXL and MERTK are membrane receptors constituting the TAM family. Their ligands are GAS6 and PROS1, vitamin K-dependent proteins. Their interaction leads to an activation of multiple signaling cascades involved in inflammatory, fibrotic, antiapoptotic, and autoimmune processes. Their behavior in these mechanisms leads to a specific interest in their role in different pathologies characterized by these processes, such as cancer, viral infections, and autoimmune diseases. Thus, we performed two studies, one on pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and another one on coronavirus disease 2019 (COVID-19). They can serve as examples of the use of these proteins' measurement to demonstrate their usage as an early detection method of these pathologies.

First, in our study of PDAC, we analyzed AXL expression by immunohistochemistry in human pancreatic tissue samples and its concentration in patients' plasma. We found that patients with PDAC had higher AXL expression compared to chronic pancreatitis and control cohorts. Thanks to a ROC analysis, we demonstrated that AXL has a better sensibility and specificity than CA19-9, the most-used biomarker in PDAC, as it can differentiate PDAC from chronic pancreatitis. These results are validated by the experiments we performed with transgenic mice, as the animals that developed PDAC showed higher AXL levels than those that did not. Also, human cell lines showed that the cancerous cells are the responsible ones for this increase.

In addition, in our study on COVID-19, we observed that patients positive for SARS-CoV-2 had higher GAS6 plasma concentrations. Indeed, those patients who needed hospitalization had higher GAS6 levels compared to patients who did not require it, being the ones who died those who had the highest levels. These findings demonstrate that GAS6/AXL system is involved in the first stages of the virus infection, so the measurement of their plasma concentration could help to a better prognosis for the patient and a more accurate treatment.

In conclusion, the measurement of TAM proteins and their ligands can be helpful, especially if used with other biomarkers. Its use could lead to a better diagnosis and treatment decision. Moreover, as their role in these pathologies demonstrates, the usage of modulators of this system, like the AXL inhibitor bemcentinib, can be useful for the prevention or treatment of these pathologies.

Índice

Índice de figuras y tablas

Abreviaturas

1. Introducción	3
1.1. Definición e historia de la familia TAM	3
1.2. Estructura y expresión de los receptores TAM	4
1.3. Estructura y función de GAS6 y PROS1.....	6
1.4. Funciones del sistema GAS6/TAM.....	12
1.4.1 Regulación de la inflamación.....	13
1.4.2 Implicación de los receptores TAM en el desarrollo del cáncer	16
1.4.3 TAMs en mecanismos de infección vírica.....	19
1.5 Producción de las formas solubles sAXL y sMERTK.....	21
1.6 Moduladores farmacológicos del sistema GAS6/TAM.....	22
1.6.1 Bemcentinib.....	23
1.7 Cáncer de páncreas	25
1.7.1 PDAC	26
1.8 Coronavirus	30
1.8.1 COVID-19	31
2. Objetivos.....	39
3. Resultados	42
3.1 Informe de los directores.	42
3.2 Resultados. Artículo 1.....	43
3.3 Resultados. Artículo 2.....	81
4. Discusión.....	99
5. Conclusiones.....	107
6. Bibliografía.....	110

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Expresión relativa de los genes del sistema TAM.

Figura 2. Estructura de los receptores TAM.

Tabla 1. Proteínas dependientes de vitamina K en humanos.

Figura 3. Estructura de los ligandos de TAM, PROS1 y GAS6.

Figura 4. Estructura e interacción entre AXL y GAS6.

Figura 5. Vías de señalización activadas por la unión de GAS6 a AXL.

Figura 6. Diversificación de la acción celular por la activación de los receptores TAM.

Figura 7. Mecanismos moleculares que participan en la transición epitelio-mesénquima.

Figura 8. Mecanismo de entrada de viriones en una célula mediado por GAS6 y AXL.

Figura 9. Estructura química de bemcentinib.

Tabla 2. Estudios clínicos que emplean bemcentinib.

Tabla 3. Selección de genes mutados en tumores PDAC.

Figura 10. Vías de señalización activadas por KRAS.

Figura 11. Estructura de SARS-CoV-2.

Figura 12. Implicación de ADAM17 y ACE2 en el mecanismo de entrada de SARS-CoV-2 a la célula huésped.

Abreviaturas

AC	<i>Apoptotic Cell</i> ; célula apoptótica
ACE2	<i>Angiotensin-converting enzyme 2</i> ; enzima convertidora de angiotensina 2
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i> ; desintegrina y metaloproteinasas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AML	<i>Acute Myeloid Leukemia</i> ; leucemia mieloide aguda
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i> ; célula presentadora de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i> ; enfermedad por coronavirus 2019
CP	<i>Chronic Pancreatitis</i> ; pancreatitis crónica
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i> ; patrón molecular asociado a daño
DC	<i>Dendritic Cell</i> ; célula dendrítica
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> ; factor de crecimiento epidérmico
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> ; transición epitelio-mesénquima
Erk	<i>Extracellular signal-Regulated kinase</i> ; quinasa regulada por señal extracelular
FN3	Fibronectina 3
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> ; proteína activadora de la actividad GTPasa
GAS6	<i>Growth Arrest-Specific factor 6</i> ; factor específico de detención de crecimiento 6
GDP	<i>Guanosine DiPhosphate</i> ; difosfato de guanosina
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i> ; factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GLA	Dominio de carboxilación/gamma carboxiglutámico dependiente de vitamina K
Gla	Ácido gamma carboxiglutámico
GTex	<i>Genotype-Tissue Expression</i> ; expresión genotipo-tejido
GTP	<i>Guanosine TriPhosphate Protein</i> ; proteína guanósín trifosfato
H/FPC	Cáncer de páncreas hereditario/familiar
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> ; carcinoma hepatocelular
HClínic	Hospital Clínic de Barcelona
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i> ; factor inducible por hipoxia
HMar	Hospital del Mar
IL-6	<i>Interleukin 6</i> ; interleuquina 6

IPMN	<i>Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm</i> ; neoplasia papilar-mucinoso intraductal
LG	Laminina G
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> ; protein quinasa activada por mitógeno
MDS	<i>Myelodysplastic Syndrome</i> ; síndrome mielodisplásico
MST1R	<i>Macrophage Stimulating 1 Receptor</i> ; receptor estimulador de macrófagos
NCM	<i>Mucinous Cystic Neoplasm</i> ; neoplasia quística mucinosa
NK	<i>Natural Killer</i> ; célula asesina
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> ; cáncer de pulmón de células no pequeñas
nTPM	Normalized Transcripts per million
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> ; patrón molecular asociado a patógenos
PanIN	<i>PANcreatic Intraepithelial Neoplasia</i> ; neoplasia intraepitelial pancreática
PDAC	<i>Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma</i> ; adenocarcinoma pancreático ductal
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> ; Fosfatidilinositol 3 quinasa
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PROS1	Proteína S
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> ; receptor de reconocimiento de patrones
PtdSer	Fosfatidilserina
RAS	RA _t Sarcoma virus
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i> ; receptor tirosina-quinasa
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> ; virus del síndrome respiratorio agudo grave
sAXL	<i>Soluble AXL</i> ; AXL soluble
SHBG	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i> ; globulina fijadora de hormonas sexuales
SLE	<i>Systemic Lupus Erythematosus</i> ; lupus eritematoso sistémico
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i> ; atlas del genoma del cáncer
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> ; factor de crecimiento transformante beta
TLR	<i>Toll-Like receptor</i> ; receptor tipo Toll
TMPRSS2	<i>Membrane PRotease Serine 2</i> ; serina-proteasa transmembranal tipo 2
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> ; factor de necrosis tumoral
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ; factor de crecimiento endotelial vascular
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i> ; célula de la musculatura lisa vascular

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Definición e historia de la familia TAM

Los TAM (TYRO, AXL, MERTK) son receptores de membrana que pertenecen a una de las 20 subfamilias de receptores del tipo tirosina-quinasa (*Receptor Tyrosine Kinase*, RTK). Sus ligandos, el factor específico de detención de crecimiento 6 (*Growth Arrest-Specific 6*, GAS6) y la Proteína S (PROS1) son proteínas multimodulares, dependientes de vitamina K, capaces de unirse a los TAM, activarlos y desencadenar una cascada de señalización. La activación de estas vías tiene un papel importante en inflamación, inmunidad innata y hemostasia, lo que genera interés por su investigación (1,2).

Los tres receptores fueron clonados por diferentes grupos de investigación a finales de los años 90. Concretamente, primero fue AXL en 1991 (3) y luego TYRO3 (4) y MERTK en 1994 (5). Fueron considerados una familia huérfana hasta que en 1995 identificaron a sus dos ligandos principales, GAS6 y PROS1 (2).

A nivel de especie, no se ha encontrado la presencia de los receptores TAM en *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* ni *Strongylocentrotus purpuratus* (erizo de mar), lo que sugiere que han surgido tardíamente en la evolución (6,7). Dentro de la familia de los RTKs, estos genes están relacionados más estrechamente con el receptor estimulador de macrófagos (*Macrophage Stimulating 1 Receptor*; MST1R) y el receptor MET, cuyos ligandos pertenecen a la familia del factor de crecimiento de hepatocitos. En el urocordado *Ciona intestinalis* se ha identificado un único gen TAM (8). Se considera que este gen TAM ancestral común en cordados se duplicó dos veces para generar los tres genes que se observan en los vertebrados modernos, probablemente durante los eventos de duplicación del genoma completo que ocurrieron durante la evolución temprana de los vertebrados (9). En la primera duplicación se produciría la separación entre AXL y el ancestro común de TYRO3 y MERTK, que se separarían en la segunda duplicación. En esta duplicación en los tetrápodos, el gen similar a AXL se perdería. Curiosamente, en los genomas actuales de las aves, no existe ninguna proteína similar a AXL, manteniéndose genes homólogos a TYRO3 y MERTK. En los tres genes TAM en mamíferos existentes se mantiene una gran similitud estructural, a pesar de tener una identidad de secuencia modesta (10).

1.2. Estructura y expresión de los receptores TAM

Aun perteneciendo a la misma familia, los tres receptores TAM se expresan en proporciones diferentes en distintos órganos y tipos celulares (Figura 1). En humanos, TYRO3 (Uniprot: Q06418), inicialmente también llamado BYK, DTK, RSE, SKY o TIF, se expresa mayoritariamente en cerebro y gónadas, siendo el receptor que presenta un patrón de extensión más restringido. De acuerdo con los datos recogidos en *The Human Protein Atlas* (11), los tipos celulares que presentan una mayor expresión del receptor son neurona y oligodendrocitos, células mesenquimales y endoteliales en ciertos tejidos, y células epiteliales y endocrinas específicas (células de Leydig). Diferentes estudios han descrito su expresión en monocitos, macrófagos, osteoclastos, células asesinas (*Natural Killer*, NK), y en plaquetas, aunque en general se expresa en poca abundancia en células de la sangre.

MERTK (Uniprot: Q12866), inicialmente también llamado MER, c-MER, EYK, NYK o TYRO12, se expresa de forma similar en diferentes órganos, más abundantemente en las glándulas suprarrenales y bazo. Esta baja especificidad de tejido se debe a que se expresa sobre todo en macrófagos residentes en los propios tejidos, como las células de Kupffer (hígado), de Langerhans (piel) y de Hofbauer (placenta) y células gliales (cerebro). También se expresa en determinados epitelios especializados (células alveolares de tipo II de los alveolos pulmonares), y en menor proporción en otras células del sistema inmune y la sangre [células dendríticas (*Dendritic Cells*, DCs), NKs, megacariocitos y plaquetas].

AXL (Uniprot: P30530), inicialmente también llamado ARK, UFO o TYRO7, es el receptor TAM que se expresa de manera más abundante en DCs y NKs, expresándose conjuntamente con MERTK en macrófagos residentes. Además, se expresa en células estromales de la médula ósea, fibroblastos en diferentes tejidos, células de ciertos epitelios especializados como queratinocitos y células de Sertoli, condrocitos y de forma abundante en células de la musculatura lisa vascular (*Vascular Smooth Muscle Cells*, VSMCs). Como consecuencia de su expresión en estos tipos celulares, que se encuentran en diversos tejidos, AXL se distribuye por la mayoría de órganos del cuerpo.

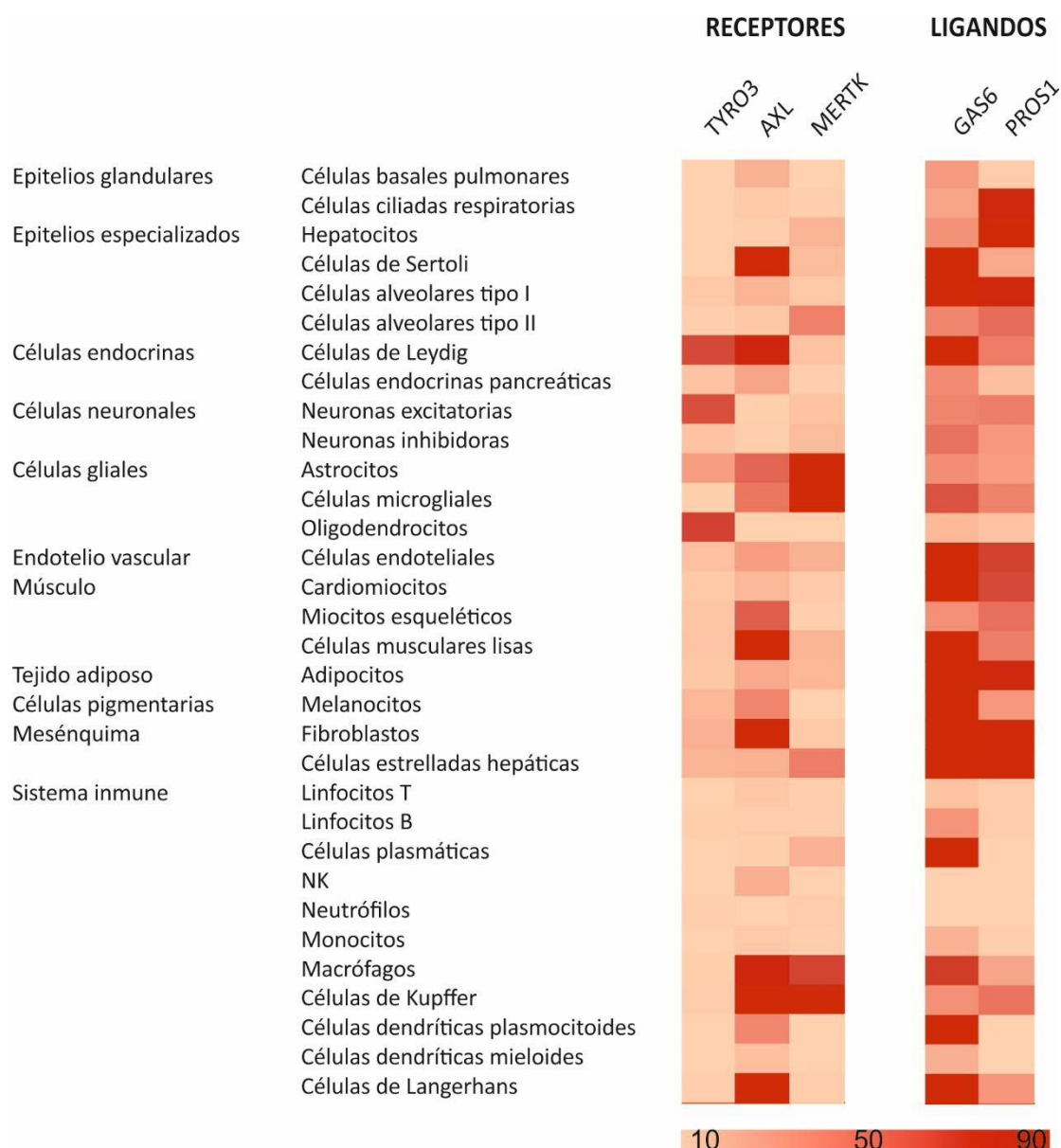


Figura 1. Expresión relativa de los genes del sistema TAM a partir de los datos de *The Human Protein Atlas*. La escala de color indica el percentil de expresión relativa (*normalized Transcripts Per Million, nTPM*) en cada tipo celular. En este diagrama se han empleado 74 tipos celulares, de los que se muestran 32. La intensidad indica que el gen más activo es GAS6, mientras que la menor expresión se observa en TYRO3. Las fuentes de información son: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000092445-TYRO3>; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000167601-AXL>; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000153208-MERTK>; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183087-GAS6> (consultado el 10/02/2022).

La estructura molecular de un receptor TAM consiste en tres dominios diferenciados (Figura 2). El dominio extracelular es donde ocurre la unión con el ligando y, una vez liberado el péptido señal, está constituido por cuatro módulos, dos motivos de tipo inmunoglobulina C2 y dos repeticiones de tipo fibronectina III (dominio FN3). A través del dominio transmembranal formado por una hélice alfa

de paso único, se encuentra unido el dominio intracelular, el cual es el que tiene actividad tirosina-quinasa (2,12,13). Este último distingue a los TAM de los demás RTKs, ya que contiene una secuencia de aminoácidos conservada, que en el caso de AXL y MERTK es KWIAIES, y en TYRO3 es KWLALLES (14,15). Concretamente, AXL es una proteína de 100 kDa, pero debido a modificaciones postranscripcionales como glicosilación, fosforilación y ubiquitinización, su peso molecular varía. Por ejemplo, la proteína AXL humana contiene seis posiciones de N-glicosilación, dando lugar a una masa aparente de entre 140 y 160 kDa, apareciendo frecuentemente en varias isoformas que varían dependiendo de la célula donde se expresa (16).

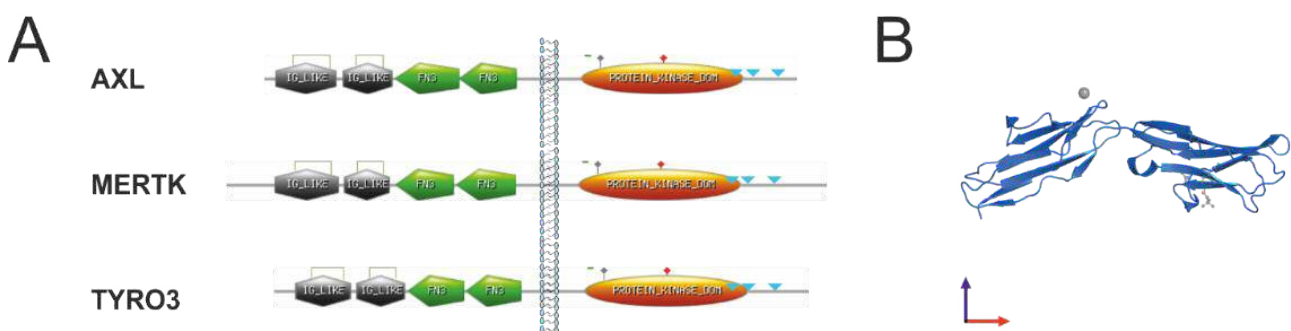


Figura 2. Estructura de los receptores TAM. En A se presenta el esquema de la estructura modular de los receptores TAM. Se indica la presencia de los diferentes dominios que componen las proteínas de acuerdo con el análisis Prosite: dos módulos similares a inmunoglobulinas (IG-like, gris), dos módulos FN3 (verde), un módulo transmembrana que atraviesa la bicapa lipídica y finalmente un módulo catalítico. Se indica la presencia de puentes de cisteína en los módulos IG, el lugar de unión a adenosina (raya verde), el centro catalítico (rombo rojo) y residuos de tirosina que se han encontrado fosforilados tras la activación del receptor (triángulos azules). En B se muestra la estructura de los módulos amino-terminales IG del receptor TYRO3 humano (PDB:1rhf).

1.3. Estructura y función de GAS6 y PROS1

GAS6 (Uniprot: Q14393) y PROS1 (Uniprot: P07225), los ligandos principales de los receptores TAM, son glicoproteínas solubles dependientes de vitamina K de aproximadamente 75 kDa, con un 43% de identidad en la secuencia aminoacídica. A nivel de especie están presentes en vertebrados, pero no en invertebrados, aunque sí se han detectado otras proteínas con cierta similitud en urocordados (13,17). Las proteínas dependientes de vitamina K son un reducido grupo de proteínas secretadas o de membrana que contienen varios residuos de glutámico modificados mediante una reacción de carboxilación dependiente de la presencia de vitamina K. En humanos, se conocen 15 genes que

codifican para estas proteínas, implicadas sobre todo en la regulación de la cascada de la coagulación, y la homeostasis del calcio (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas dependientes de vitamina K en humanos. Se representa su estructura modular de acuerdo con la clasificación de Prosite.

Proteína (humana)	Gen	ID	Estructura	Función
Protrombina	<i>F2</i>	2147		Proteasa de serina
Factor VII	<i>F7</i>	2155		Proteasa de serina
Factor IX	<i>F9</i>	2158		Proteasa de serina
Factor X	<i>F10</i>	2159		Proteasa de serina
Proteína C	<i>PROC</i>	5624		Proteasa de serina
Proteína Z	<i>PROZ</i>	8858		Similar a proteasas
Proteína S	<i>PROS1</i>	5627		Cofactor/Ligando
GAS6	<i>GAS6</i>	2621		Ligando
Gla transmembrana 1	<i>PRRG1</i>	5638		Transmembrana/receptor
Gla transmembrana 2	<i>PRRG2</i>	5639		Transmembrana/receptor
Gla transmembrana 3	<i>PRRG3</i>	79057		Transmembrana/receptor
Gla transmembrana 4	<i>PRRG4</i>	79056		Transmembrana/receptor
Proteína rica en Gla	<i>UCMA</i>	68527		Unión a Ca ⁺²
Osteocalcina	<i>OSTCN</i>	632		Unión a Ca ⁺²
Proteína Gla de matriz	<i>MGP</i>	4256		Unión a Ca ⁺²
Periostina*	<i>POSTN</i>	10631		Adhesión celular

GLA

Loop

Kringle

Proteasa de serina

EGF

LG

Transmembrana

EMI

FAS1

*Resultados contradictorios sobre su gamma-carboxilación.

La estructura modular de GAS6 y PROS1 es idéntica. Consiste en un dominio amino-terminal llamado GLA, debido a que contiene residuos de ácido γ -carboxiglutámico (Gla), por donde se une a membranas fosfolipídicas, seguido de un *loop* sensible a la trombina y 4 dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Finalmente, en el extremo C-terminal, se presentan 2 repeticiones de laminina G (LG1 y LG2), las cuales forman lo que se llama un dominio similar a la globulina fijadora de hormonas sexuales [*Sex Hormone Binding Globulin*, SHBG (2,13,18)]. Este último dominio es el que interacciona con los receptores TAM. La estructura de GAS6 se muestra en la Figura 3.

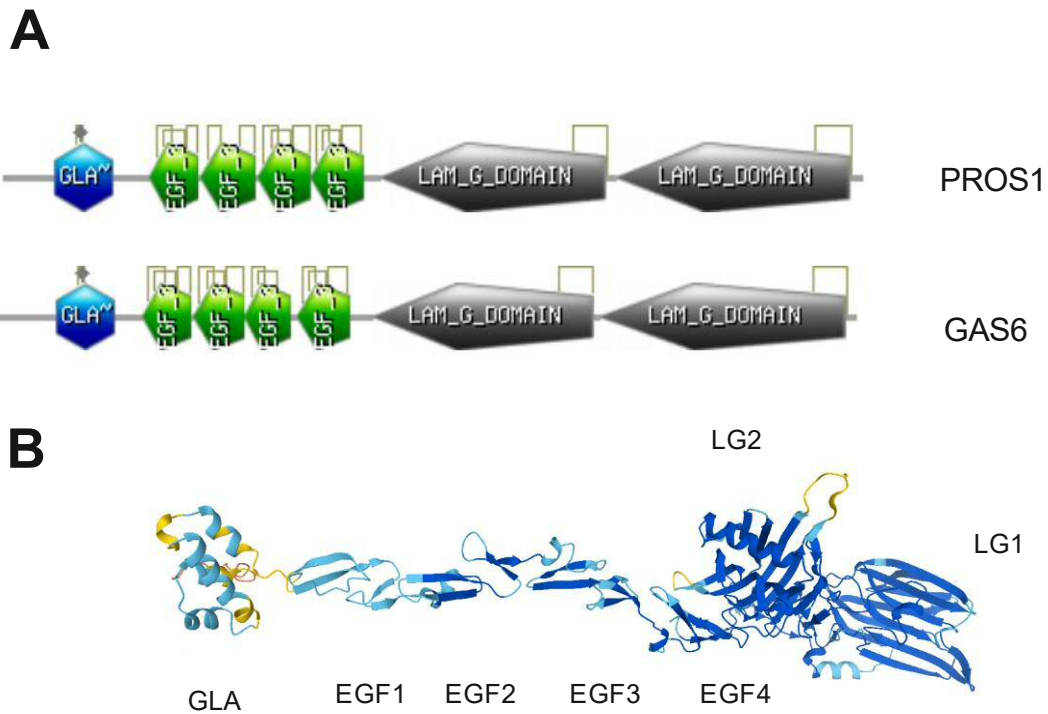


Figura 3. Estructura de los ligandos de TAM, PROS1 y GAS6. A, estructura modular de los ligandos según el análisis de Prosite. La distribución de módulos es idéntica entre los dos ligandos, existiendo únicamente pequeñas diferencias en la extensión de los mismos. Se indican los puentes disulfuro en cada dominio. B, modelo de la estructura de GAS6 según el programa AlphaFold desarrollado por DeepMind (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>; consultado el 1/03/2022). Se ha eliminado el péptido señal, representándose el péptido correspondiente a la proteína madura. El dominio LG2 aparece plegado sobre el módulo EGF4.

GAS6 y PROS1 presentan afinidades diferentes para los tres receptores TAM, que además difieren entre especies. GAS6 puede unirse a los tres receptores, a AXL con mayor afinidad y a MERTK con la que menos. En cambio, PROS1 solo puede ligarse y activar a TYRO3 y MERTK (2,18). Aun así, ha habido estudios que han demostrado que en ocasiones PROS1 también puede unirse a AXL (19). En la activación de los receptores juega un papel importante la presencia de membranas fosfolipídicas que contengan fosfatidilserina (PtdSer).

La función de PROS1 es más conocida y se le ha otorgado un papel anticoagulante (20). Como otras proteínas de la coagulación, el gen que la produce, *PROS1*, se expresa sobre todo en los hepatocitos, desde donde se libera a la sangre. Sin embargo, su expresión no está tan restringida como otros genes de la cascada de la coagulación. Así, se expresa de manera significativa en epitelios del pulmón, células mesenquimales y adipocitos (Figura 1). A diferencia de otras proteínas dependientes de vitamina K de la coagulación (Tabla 1), e igual que GAS6, no tiene un dominio serina-proteasa,

careciendo de actividad enzimática. Actúa como cofactor de la Proteína C activada en la degradación de los factores Va y VIIIa de la coagulación y en la unión del inhibidor de la vía del factor tisular sobre el factor Xa (21,22). La importancia de su función anticoagulante se demostró en los años ochenta cuando se describieron familias que presentaban una deficiencia hereditaria en PROS1 que causaba trombosis venosa (trombofilia). Si la deficiencia era homocigota, se producía una muerte perinatal por la activación incontrolada de la coagulación (23). Asimismo, los ratones *knockout* para *Pros1* presentan mortalidad perinatal (24). No obstante, estas funciones parecen ser fundamentalmente independientes de la interacción con los receptores TAM.

En cambio, la función de GAS6 sí estaría más estrechamente ligada a la activación de los TAM, siendo su papel más heterogéneo y no totalmente establecido. La interacción entre GAS6-AXL, las dos proteínas en las que se centra esta tesis, provoca una regulación de supervivencia, proliferación y migración celular, adhesión célula-célula y facilita la fagocitosis de células apoptóticas (*Apoptotic Cells, ACs*) (2,18,25).

GAS6 se expresa frecuentemente en células que a su vez expresan AXL, por lo que en estos tipos celulares se ha considerado que puede exponerse en la membrana plasmática formando un complejo con el receptor preformado intracelularmente (26). Este es el caso de las DCs, VSMCs, fibroblastos y células de Sertoli. Sin embargo, otros tipos celulares que expresan GAS6 de manera abundante, incluyendo neuronas como las horizontales de la retina, el endotelio, las células alveolares tipo I y los cardiomiocitos, no expresan AXL o solamente a bajo nivel (Figura 1). GAS6 tampoco se expresa de manera abundante en NKs, la mayoría de macrófagos residentes ni en monocitos.

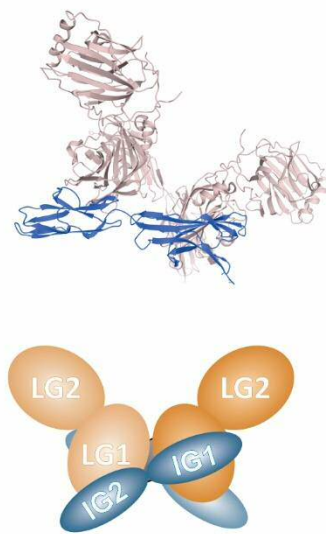
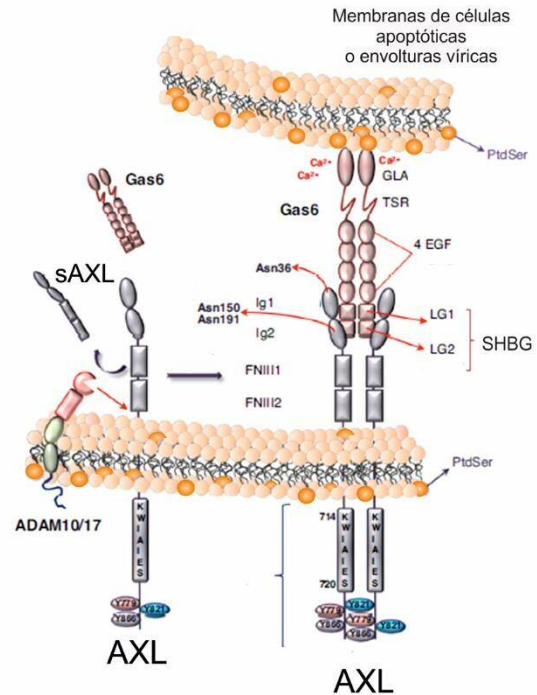
A**B**

Figura 4. Estructura e interacción entre AXL y GAS6. A, estructura cristalográfica del complejo entre los módulos IG de AXL y el dominio SHBG de GAS6 (pdb: 2C5D, (27)). Ligando y receptor aparecen como dímeros en la estructura. En azul se muestra la secuencia de AXL más próxima. Debajo se muestra la disposición de los módulos en la estructura del cristal. La superficie principal de contacto involucra a los módulos IG1 de AXL y LG1 de GAS6; un contacto secundario se observa entre el IG2 de AXL y el LG1 de la segunda molécula de GAS6. B, esquema del reconocimiento de GAS6 por AXL en la membrana. Se indican los dominios implicados y la interacción con las proteasas ADAM que inhiben la señalización mediante la proteólisis de los receptores TAM. Modificado de (28).

Para desempeñar estas funciones es necesario que el dominio GLA de GAS6 se una, de forma dependiente de calcio, a las PtdSer negativamente cargadas que se encuentran en la membrana plasmática de las ACs (Figura 4B), plaquetas activadas o en la envoltura de los virus (29). La PtdSer es un componente de las membranas lipídicas que en condiciones normales se mantiene en la cara interna de la membrana celular. Esta asimetría en la distribución de la PtdSer se produce por un proceso activo de internalización de estos fosfolípidos, mediado por enzimas conocidas como flipasas. Cuando este proceso se detiene, se pierde la asimetría, exponiendo así la PtdSer en la capa exterior, donde interacciona con los dominios GLA de GAS6. Esta unión es gracias a que el dominio GLA de GAS6 contiene residuos de ácido glutámico que son γ -carboxilados mediante una reacción dependiente de vitamina K, como indicamos anteriormente (6,30,31).

Varios estudios han demostrado que el dominio GLA es crucial para la activación de las vías de señalización, ya que han visto que, si GLA está truncado, GAS6 sí puede unirse a AXL, pero no activarlo

(32). Una vez GAS6 está unido a las PtdSer por su región amino-terminal, también se une por su región SHBG a las regiones de tipo inmunoglobulina del receptor. Todo esto provoca la dimerización y autofosforilación del receptor. La autofosforilación de AXL se produce en hasta 6 posiciones del dominio intracelular del receptor (TYR698, TYR702, TYR703, TYR779, TYR821 y TYR866), permitiendo el reclutamiento de moléculas adaptadoras con dominios de unión a fosfotirosinas, como GRB2 (31). A partir de esta reacción se inicia la cascada de señalización, activando las vías de PI3K/AKT, ERK1/2 y otras proteína-quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*; MAPKs) o fosfolipasa C (Figura 5), para así promover la supervivencia, crecimiento y proliferación celular dependiendo de cada entorno celular específico (15,28,33,34). De esta manera, se puede considerar que el sistema de ligandos (PROS1 y GAS6) y receptores TAM es un sistema de detección de la presencia de PtdSer en las membranas celulares (26,35). Las estructuras, interacción y las vías de señalización entre el receptor AXL y su ligando GAS6 se esquematizan en las Figuras 4 y 5.

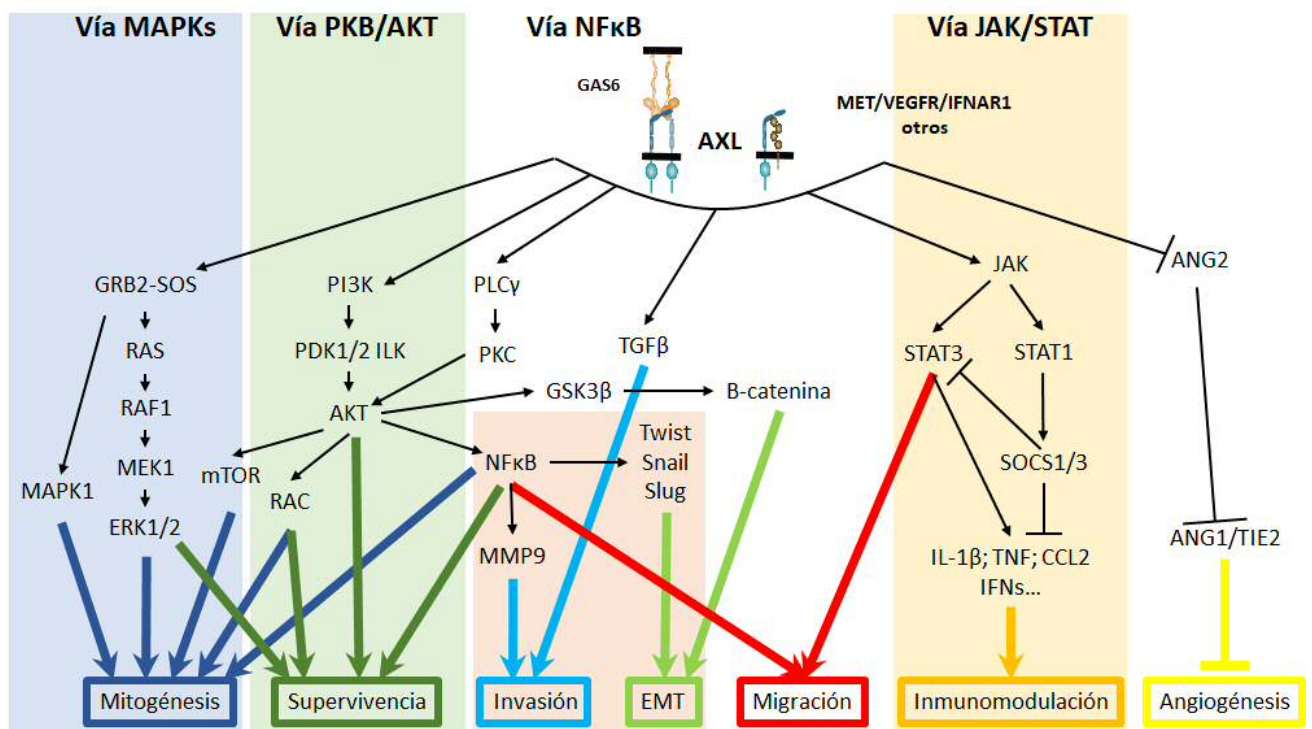


Figura 5. Vías de señalización activadas por la unión de GAS6 a AXL. Como otras RTKs, la interacción de AXL con su ligando inicia la señalización por diferentes vías intracelulares de proteína quinasa, esquematizadas aquí. Además, AXL puede interactuar con otros receptores para iniciar señales similares a las que se producen con la unión a GAS6. Las vías de señalización tienen frecuentemente más de un efecto celular. Al integrarse entre sí y con otros estímulos que recibe la célula, se producen respuestas complejas como las indicadas en la parte inferior. Modificado a partir de (36).

Sin embargo, los receptores TAM, y en concreto AXL, pueden activarse de maneras alternativas independientes de ligando (Figura 5). Se ha visto que AXL puede formar homodímeros cuando se sobrexprende en la membrana celular, ya sea de la misma célula o de células diferentes, induciendo la agregación celular de manera similar a las moléculas de adhesión (37). También se ha visto que AXL puede formar heterodímeros con otros miembros de la familia TAM y otros RTKs como el receptor de interferón alfa (*Interferon- α/β Receptor*; IFNAR) y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular A (*Vascular Endothelium Growth Factor A*; VEGF-A), aunque la implicación biológica de estos hallazgos no se conoce en profundidad (15,38–40). Además, diversos estudios han demostrado que GAS6 y PROS1 no serían los únicos ligandos de los TAM. Especialmente, MERTK puede interactuar con otros sistemas de reconocimiento de células apoptóticas como las proteínas de la familia Tubby en la retina y ciertas galectinas (41).

1.4. Funciones del sistema GAS6/TAM

En el momento en que se clonaron los genes y se determinó la interacción entre GAS6/PROS1 y los receptores TAM (1995), la función biológica de este sistema de ligandos y receptores era desconocida, aparte de la implicación de PROS1 en la regulación de la coagulación. El uso de ratones modificados genéticamente, *knockout* para las proteínas GAS6 y los TAMs, ha permitido describir los mecanismos moleculares en los cuales participan. Un ratón modificado para ser deficiente en los tres receptores TAM es viable y fenotípicamente normal, lo que demuestra que esta familia de proteínas no es necesaria durante la embriogénesis. No obstante, a medida que el animal va creciendo, desarrolla una deficiente remoción de ACs, forman autoanticuerpos y tiene una señalización proinflamatoria hiperactiva, dando lugar a síntomas similares a los que producen las enfermedades de tipo autoinmune, además de otras irregularidades como ceguera y esterilidad (1,2,42,43).

Estas observaciones demostraron que el sistema GAS6/TAM está involucrado en la respuesta inmunitaria a través de varios mecanismos, incluyendo el control de la inflamación (1,25,43,44), la eliminación de ACs o eferocitosis (13,43,45,46), la protección contra la trombosis y la regulación de la coagulación (47–49), y la diferenciación de células NK (50–52). Además, debido a sus efectos celulares, el sistema participa en mecanismos patológicos, como en el desarrollo del cáncer (16,19,30,53–56) y se ha identificado como un mecanismo de entrada de diversos virus a la célula huésped (57–59).

1.4.1 Regulación de la inflamación

La inmunidad innata es el primer sistema de defensa contra agentes patógenos. Este sistema es inespecífico y carece de memoria inmunológica, pero es el que más rápido actúa frente a un patógeno (60). En los procesos implicados, los principales protagonistas celulares son macrófagos, NKs, DCs, eosinófilos, basófilos y neutrófilos, aunque los TAM solamente se expresan muy significativamente en macrófagos y DCs en su estado basal (13). Concretamente, las DCs son las células presentadoras de antígeno (*Antigen-Presenting Cells*, APC) más potentes que se conocen. Son capaces de detectar y procesar los antígenos de agentes patógenos y mostrárselos a los linfocitos T, para así desencadenar una respuesta inmune adaptativa (60). Estas células expresan los tres miembros de la familia TAM (Figura 1), aunque TYRO3 apenas abunda, mientras que AXL es el receptor TAM que se encuentra más expresado (1).

Uno de los mecanismos de la respuesta innata es la inflamación, donde GAS6 y los TAM tienen un papel regulador por su efecto inhibitorio sobre los receptores tipo Toll (*Toll-Like Receptor*, TLR) (1,2,13,46). La familia TLR consta de 13 miembros en humanos y son un tipo de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (*Pattern Recognition Receptor*, PRR). Estas proteínas transmembranales son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*, PAMP) procedentes de virus, bacterias y hongos, entre otros patógenos, y activar la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (*Interleukin 6*, IL-6), el factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), y los interferones (61–64).

A nivel molecular, las DCs expresan niveles tímidos de AXL en condiciones basales, pero cuando son activadas su expresión se multiplica (65). En el momento en que los PAMPs se exponen a TLR4, presente en la membrana, y a TLR3, presente en endosomas, se produce un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias por medio de las vías de JAK/STAT (por *JANus Kinase/Signal Transducer and Activation of Transcription*), de IRF3/7, AP-1 y NFκB. Cuando estas citoquinas estimulan la expresión de AXL (o MERTK), éste interacciona con IFNAR, provocando la dimerización y translocación al núcleo de STAT1, induciendo la expresión de SOCS1 y SOCS3. Este tipo de proteínas SOCS (por *Supressor Of Cytokine Signaling*) inhiben directamente la señalización provocada por TLR y otros receptores de citoquinas, volviendo a las DCs a su estado basal (2,13,46).

De hecho, hay estudios *in vitro* que muestran que las DCs de ratones deficientes en AXL y/o MERTK, tras la activación de los TLRs, producen niveles muy elevados de citoquinas proinflamatorias. Asimismo, cuando estas células se tratan con GAS6, disminuyen significativamente los niveles de producción de estas citoquinas (46).

La inflamación debe ser correctamente controlada, ya que una activación excesiva puede resultar en una inflamación crónica. Además, si hay una deficiente remoción de ACs, se pueden acumular células necróticas y liberar patrones moleculares asociados a daño (*Damage Associated Molecular Patterns*; DAMPs) que a su vez son reconocidos por el sistema inmune adaptativo generando autoanticuerpos. Esto puede conducir a enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (*Systemic Lupus Erythematosus*, SLE) y psoriasis (61). Este tipo de respuesta es similar a la que se observa en ratones adultos deficientes en los tres TAM, o MERTK y AXL.

Sin embargo, otros estudios apuntan a que GAS6 puede inducir vías inflamatorias. Así, ratones deficientes en GAS6 presentan una menor activación endotelial (66), lo que se manifiesta como una reducción en la formación de trombos (67). Además, esta menor activación del endotelio en ausencia de GAS6 disminuye la correcta extravasación de células del sistema inmunitario, como los monocitos (66,68). Este efecto se produce debido a la inducción por GAS6 del sistema CCR2-CCL2, y tiene importantes implicaciones en la tromboinflamación, esto es, los procesos de inducción inflamatoria asociada a trombosis (68,69).

Recientemente, varios estudios en modelos de patología crónica han encontrado un aumento de la inflamación asociado a la activación de la vía de GAS6/AXL. En la respuesta inflamatoria de la pared de los vasos, se ha propuesto que AXL es capaz de inhibir SOCS1 y de esta manera aumentar la respuesta inflamatoria de las VSMCs (70). En modelos de enfermedades fibróticas del hígado, la inhibición farmacológica de AXL disminuye la expresión de genes inflamatorios, incluyendo CCL2/MCP-1 en células estrelladas hepáticas (71). Un efecto proinflamatorio del eje GAS6/AXL se ha demostrado también en el contexto del daño por isquemia reperusión en el corazón, donde la activación de AXL aumenta la producción de IL-1 β por macrófagos residentes a través de STAT1, de manera opuesta al efecto cardioprotector de la activación de MERTK (72).

Debido a estas y otras evidencias de la dualidad del sistema GAS6/TAM en el contexto de la inmunidad innata, no podemos decir que estas moléculas actúan como pro- o antiinflamatorios, si no que debemos considerarlos como reguladores de los mecanismos de la inflamación. Como vemos, la

activación de AXL se ha asociado en varios estudios con efectos proinflamatorios (AXL→inflamación), mientras que en general se observa un aumento de la respuesta inflamatoria en ausencia de MERTK o tras su inhibición (MERTK \neg inflamación). Este esquema se basa fundamentalmente en resultados obtenidos en ratones *knockout* para estos receptores. Sin embargo, se debe recordar que estos modelos adaptan su inmunidad a la ausencia de moléculas como los TAM, por lo que los resultados pueden no ser interpretables de manera directa o sencilla.

Un ejemplo de la dificultad en asignar un papel concreto al sistema TAM en la inflamación son los estudios en modelos de daño pulmonar. Inhibiendo de manera farmacológica la actividad de MERTK, se ha descrito una inhibición de la respuesta inflamatoria en daño pulmonar agudo inducido por LPS (73), por lo que en este caso MERTK tendría un papel proinflamatorio (MERTK→inflamación). En otro estudio de daño pulmonar agudo por isquemia reperusión, la activación de AXL por GAS6 demostró en cambio propiedades antiinflamatorias (74). En general, en el sistema inmune, el sistema GAS6/TAM produce efectos complejos que son dependientes del tipo celular, los ligandos disponibles, y el grado de activación de las células, como se resume en la Figura 6.

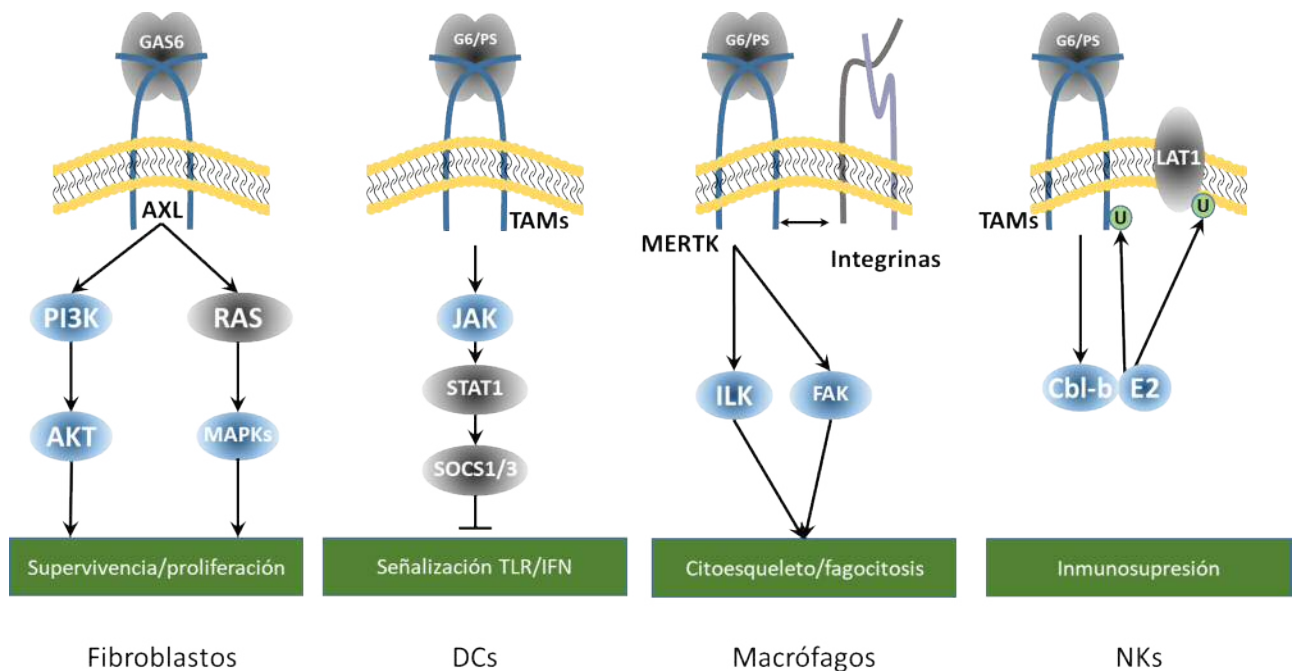


Figura 6. Diversificación de la acción celular por la activación de los receptores TAM. La señalización por GAS6 a través de AXL se describió primero como una señal mitogénica y antiapoptótica a través de la activación de las vías de PI3K/AKT y MAPKs (91). Estos estudios se realizaron sobre todo en fibroblastos y en líneas celulares cancerosas. En células del sistema inmune se han demostrado otras vías de señalización que son importantes para la función de estos tipos celulares. En DCs se ha demostrado un efecto antiinflamatorio debido a la activación de los genes que sintetizan las SOCS

(46). La fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos (y DCs) requiere un reordenamiento del citoesqueleto en el que están implicadas integrinas y la activación de las quinasas ILK y FAK (39). Recientemente se ha propuesto que las NKs reducen su función a través de la activación del complejo Cbl1-b/E2 que ubiquitina e induce la degradación de LAT, además de los propios receptores TAM (51). Los diferentes efectos celulares de la activación de los TAM pueden deberse a las características de las células donde actúan, a diferencias en el tipo de TAM que expresan las células, o a los ligandos a los que están expuestas.

1.4.2 Implicación de los receptores TAM en el desarrollo del cáncer

Los tres miembros de la familia TAM se han encontrado sobreexpresados en diferentes tipos de tumores, tanto líquidos como sólidos, de manera frecuente (55). La expresión de TYRO3 se ha visto aumentada en melanoma (75–77), cáncer de pulmón, y cáncer de mama (78,79). MERTK se sobreexpresa en melanoma, cáncer gástrico, leucemia, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer de pulmón (77,80,81). En el caso de AXL, quizá el receptor TAM que más se ha estudiado en el contexto del cáncer, está aumentado en melanoma (77), cáncer de mama (80,82), cáncer de páncreas (83–85), cáncer colorrectal (86,87) y cáncer de pulmón (88,89), entre otros.

En múltiples estudios se ha asociado la presencia de AXL en células tumorales con un mal pronóstico del cáncer (31,42). Esto se debe a que está relacionado con un aumento en el crecimiento, proliferación, invasión y supervivencia de las células cancerígenas. Además, la sobreexpresión de AXL aumenta la capacidad metastásica de células tumorales. Finalmente, AXL es capaz de conferir resistencia a la quimioterapia en diferentes contextos, como el cáncer de mama, de pulmón, próstata, hígado y leucemia mieloide aguda, entre otros (31,42). Esta resistencia se da frente a quimioterápicos muy diversos, incluyendo fármacos inhibidores de quinasas, dirigidos al citoesqueleto o dirigidos contra el metabolismo del ADN (36).

Como en otros RTKs, la unión de GAS6 a AXL provoca la activación de la vía de RAS, que a su vez activa la vía de las MAPKs, induciendo supervivencia y proliferación celular (90). Asimismo, se produce una activación de la vía PI3K-AKT, lo que provoca un aumento de proteínas antiapoptóticas, como BCL2, MCL-1 y survivina, y una disminución de proteínas proapoptóticas, como BAD (91–93). Todo ello resulta en un crecimiento del tumor gracias al aumento de la supervivencia y proliferación de células cancerosas y la evasión de la apoptosis.

La transición epitelio-mesénquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT) es otro evento característico del cáncer en el que participa GAS6/AXL, siendo además crucial para la metástasis. La EMT es un proceso en el cual las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal al perder su polaridad y uniones celulares. Esto les confiere capacidad migratoria e invasiva, resistencia a la apoptosis y un aumento de la producción de componentes de la matriz extracelular (principalmente colágeno I y ácido hialurónico). Es decir, es mediante la EMT que las células residentes en un tumor primario se despegan, entran en la circulación e invaden otros tejidos para formar nuevos tumores (94–96).

Los mecanismos moleculares asociados a EMT incluyen las vías de señalización de Wnt, RTKs, TGF β , HIF1 α , Notch y citoquinas como TNF (Figura 7). El resultado de la activación de todas estas vías es la inducción de los factores de transcripción Snail, Slug y Twist, los cuales se translocan al núcleo, provocando la síntesis de proteínas que otorgan a las células cancerígenas propiedades de células madre, la resistencia a fármacos e inmunosupresión, y la estimulación de la metástasis. Concretamente, el primer evento que debe ocurrir para que se desencadenen todos estos procesos es la represión del gen *CDH1* por parte de los factores de transcripción indicados. Esto provoca la disminución de la cadherina E, marcador por excelencia de EMT, induciendo el fenotipo mesenquimal de las células, y promoviendo la metástasis que permite la invasión de nuevos nichos celulares (94–98).

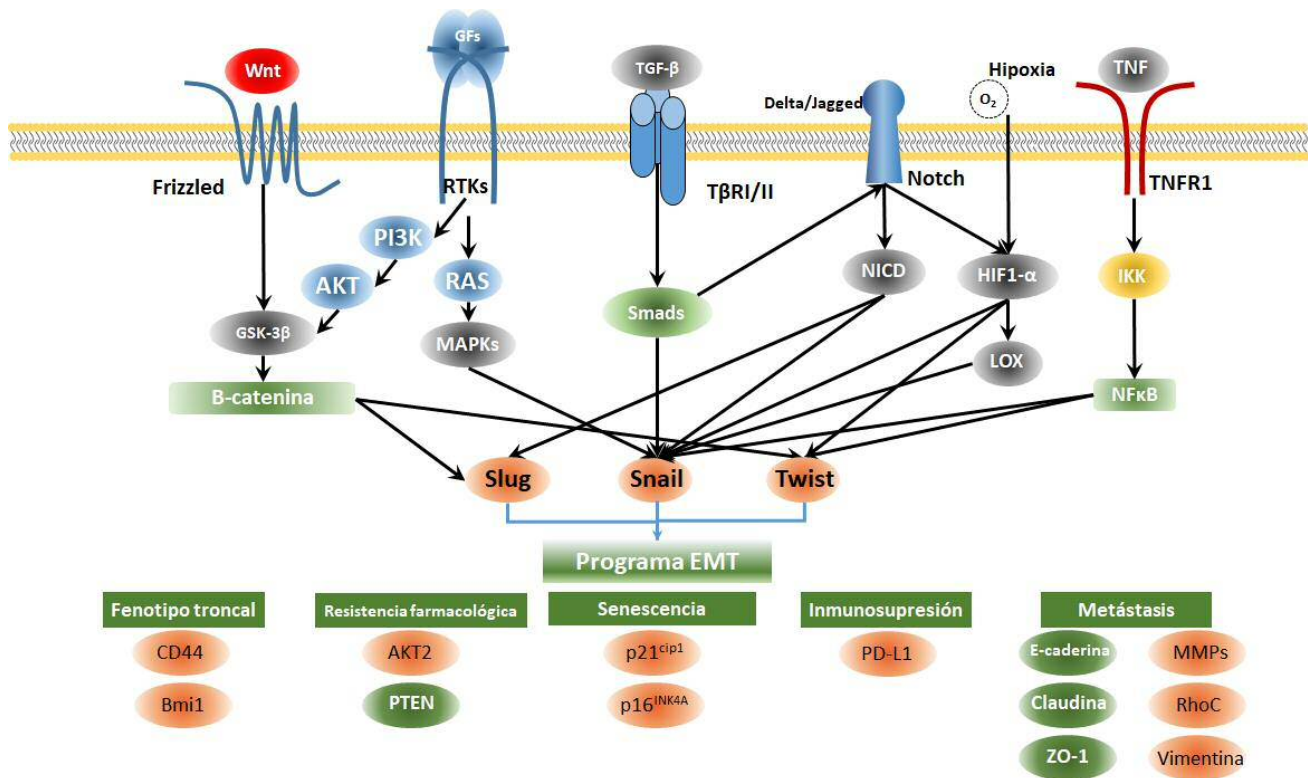


Figura 7. Mecanismos moleculares que participan en la transición epitelio-mesénquima. Se indican las vías de señalización implicadas en el control de la transición epitelio-mesénquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT). Modificado a partir de (99). La activación de las vías del receptor de factor de crecimiento tumoral beta (TGF-β), Wnt, Notch, RTKs (incluyendo los TAMs), la hipoxia y el receptor del TNF conduce a la activación y translocación nuclear de varios factores de transcripción incluyendo Snail, Slug, y Twist, produciendo la inducción de esta transición celular. La EMT confiere a las células características de tipo troncal. En el caso de las células tumorales, aumenta su capacidad metastática al eliminar la inhibición del crecimiento por contacto.

Específicamente, en el proceso EMT, AXL activa las mismas vías que activan otros receptores de factores de crecimiento: las MAPKs ERK1/2 y JNK y la vía de PI3K/AKT, que a su vez hacen que aumente la expresión de factores de transcripción de EMT indicados: Snail, Slug y Twist, aumentando la expresión de cadherina N y disminuyendo la de cadherina E (30,53,55). Además, el sistema GAS6/AXL provoca un aumento de la producción de moléculas de adhesión y metaloproteinasas, como MMP9, que degradan la matriz extracelular y favorecen la migración celular (100–102). Como resultado final, GAS6/AXL favorece la metástasis tumoral.

Diversos estudios han propuesto que los factores inducibles por hipoxia 1 y 2 (*Hypoxia-Inducible Factor*, HIF1 y HIF2) son los responsables de la activación de la vía de GAS6/AXL, desencadenando todos los eventos explicados anteriormente (103,104). Estos factores de transcripción son protagonistas en el microambiente de los tumores sólidos y su expresión se asocia con una mayor

capacidad metastásica en muchos tipos de cáncer y, por tanto, con un peor pronóstico de la enfermedad.

Dado el papel que tiene GAS6/AXL y la subsiguiente cascada de señalización en el microambiente tumoral, el uso de moduladores de este sistema podría ayudar a combatir o prevenir el cáncer (ver 1.6). Asimismo, GAS6 y las formas solubles y de membrana de AXL podrían ser utilizados para el diagnóstico y pronóstico de esta patología.

1.4.3 TAMs en mecanismos de infección vírica

El estudio del contacto y la fusión de las envolturas de los virus animales con la membrana de la célula huésped es un campo de investigación muy activo, ya que supone el primer paso en la infección vírica. Las glicoproteínas víricas que se localizan en esta envoltura se anclan en receptores específicos. En este contexto, Morizono et al. descubrieron en 2011 que los receptores TAM, y en concreto AXL, podían actuar como receptores víricos empleando sus ligandos como puentes entre el virión y la célula huésped (105). Posteriormente, el estudio del sistema GAS6/AXL en virología ha aumentado su interés, ya que se ha demostrado su papel en la invasión de las células huésped por diferentes virus asociados a patologías humanas, como los del Zika, Lassa, Ébola y Dengue (58,59,106–108).

A nivel molecular, las PtdSer presentes en la membrana de los virus son reconocidas y unidas por GAS6, éste se une a los TAM y produce una autofosforilación en la zona intracelular que sería necesaria para la infección vírica. De esta manera, el virus es endocitado en un proceso mediado por clatrina y queda internalizado en forma de endosoma. En este contexto, GAS6 actúa como opsonina entre el virus y la célula huésped, la cual expresa AXL en su membrana (29,35). Como hemos visto anteriormente, una vez AXL está activado, éste interacciona con IFNAR, provocando la homodimerización y autofosforilación de STAT1, la cual hace que aumente la expresión de SOCS1 y SOCS3, además de inhibir la producción de IFN-I (Figura 8). Por tanto, AXL facilita la infección y replicación vírica a dos niveles: actuando como receptor de anclaje y endocitosis e inhibiendo localmente la respuesta inmune (109,110).

El virus en el que el papel de GAS6/AXL se ha estudiado mejor es el virus del Zika. Este virus está presente en diferentes fluidos corporales, como en la sangre, saliva, semen y orina. Esto se debe a que cuando el virus llega al torrente sanguíneo infecta preferencialmente a las células endoteliales, incluso puede sobrepasar la barrera hematotesticular, la barrera hematoencefálica y la barrera hematoplacentaria, eventos que no suceden en infecciones producidas por otros flavivirus (110–

112). Cuando el Zika tiene como células huésped a células de Sertoli, las cuales ya de forma basal tienen una alta expresión de AXL (Figura 1), tiene lugar una infección persistente. Este hecho supone un problema mayor, ya que los hombres que lo padecen pueden contagiar a sus parejas sexuales, y las mujeres pueden pasarlo al feto, provocando anomalías fetales (microcefalia) e incluso abortos. En la Figura 8 se ilustra esquemáticamente el mecanismo de entrada del virus mediado por AXL que podría darse en células de Sertoli en presencia del virus del Zika.

Dada la implicación de AXL en la entrada del virus del Zika, se ha propuesto AXL como diana terapéutica en esta infección. De hecho, se ha visto que con la inhibición de AXL se disminuyen los niveles de SOCS1 y SOCS3, lo que decrece la capacidad de replicación vírica, aunque no previene la entrada del virus a la célula huésped (58,59,113). Aun así, cabe decir que se ha visto que el virus del Zika es capaz de infectar células del organismo por mecanismos en los que AXL no participa (114).

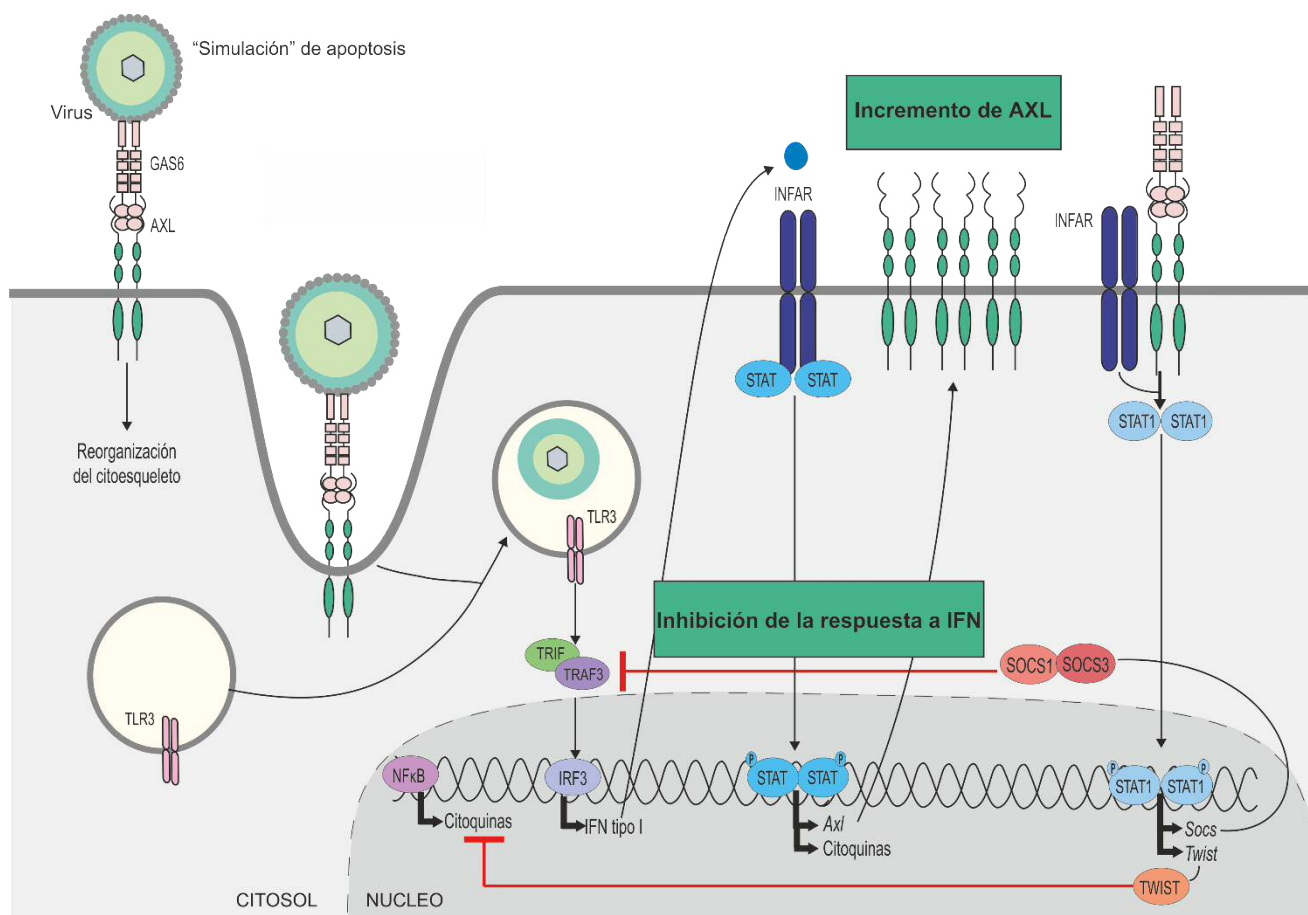


Figura 8. Mecanismo de entrada de viriones en una célula mediado por GAS6 y AXL. El mecanismo de interacción del sistema GAS6/AXL (y otros TAMs) implica la interacción del dominio dependiente de vitamina K (GLA) de GAS6 con la envoltura de virus como el del Zika, posiblemente a través de una simulación de apoptosis por la presencia de PtdSer. La

expresión elevada de AXL en las células diana, como en el caso de las células de Sertoli, facilitaría su infección. Modificado de (115).

De manera más general, el papel que desempeñan GAS6 y AXL en el mecanismo de entrada y de replicación de virus sugiere que el uso de moduladores de este sistema podría ayudar a prevenir la infección o a paliar los síntomas producidos por el mismo.

1.5 Producción de las formas solubles sAXL y sMERTK

Las desintegrinas y metaloproteinasas 10 (*A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10*; ADAM10) y 17 (ADAM17, también llamada TACE), son enzimas extracelulares unidas a la membrana plasmática de la célula y que normalmente participan en reparación y remodelación tisular e inflamación (116). Estas proteínas son capaces de escindir la zona entre el dominio FN3-2 y la región transmembranal de AXL y MERTK y posiblemente TYRO3 (Figura 4B), liberando al plasma las formas solubles de los receptores, llamadas sAXL y sMERTK respectivamente (117,118). Estas formas solubles pueden ser internalizadas y transportadas para el reciclaje de proteínas de membrana o pueden ser liberadas al espacio extracelular. En este último caso, sAXL y sMERTK siguen siendo capaces de unirse a GAS6, secuestrándolo. La proteólisis de los TAM reduce los niveles de receptores viables en la superficie celular, dando lugar a una regulación negativa de las vías (2,118,119).

Diversos estudios han visto que en condiciones proinflamatorias hay un aumento de los niveles circulantes de sAXL, actuando como un mecanismo de control negativo de la acción de GAS6. Esto sugiere que AXL y MERTK, tanto en formas solubles como de membrana, pueden ser indicadores de la actividad de estas vías (1,18,25,44,120–123).

Particularmente, se ha visto que el sistema GAS6/AXL está implicado en procesos inflamatorios (44), fibrosis (71), proliferación celular (15,124) e inhibición de la apoptosis (46), por lo que tanto GAS6 como AXL y MERTK podrían ser unos buenos biomarcadores de patologías humanas caracterizadas por estos procesos. Estos biomarcadores podrían incluir tanto las formas solubles como las que se encuentran en la membrana, así como los transcritos de los genes del sistema. En algunas patologías como el cáncer (6,55), la esclerosis múltiple (125,126), sepsis (127), lupus (117), la insuficiencia renal (128,129), la insuficiencia cardíaca (130) e infecciones virales (107) ya se ha demostrado la importancia del sistema GAS6/TAM, por lo que podrían tener un uso para el diagnóstico, pronóstico y/o evaluación de terapias (28).

1.6 Moduladores farmacológicos del sistema GAS6/TAM

De acuerdo con el papel propuesto para GAS6/TAM en el desarrollo de diversas patologías, se han desarrollado diversos tipos de moduladores del sistema GAS6/TAM para su aplicación médica según el papel que tenga este sistema en la patología. Los principales usos para los que se están investigando son para el tratamiento de diferentes cánceres (131–133), para el tratamiento de enfermedades fibróticas [especialmente de pulmón (134,135), hígado (71,136) y riñón (133,137)], para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (138) y para combatir infecciones víricas (57,139), como se ha mencionado anteriormente en el caso de la entrada del virus del Zika.

Actualmente, se están desarrollando tanto agonistas como inhibidores del sistema GAS6/AXL por diversas empresas. Entre los diferentes moduladores que existen, se encuentran en estudio moléculas orgánicas pequeñas como bemcentinib (140–142), aptámeros dirigidos contra AXL como GL21.T (16,143,144), proteínas recombinantes y péptidos basados en la secuencia de GAS6 (145), anticuerpos anti-AXL como YW327.6S2 (146) y sistemas basados en células similares a CAR-T (147–150). Una revisión reciente de Di Stasi et al., detalla todos los moduladores de AXL que han sido creados hasta el momento, indicando su diana, en qué estado de los ensayos clínicos se encuentran y para qué patologías están siendo evaluados (28).

A día de hoy, los moduladores que más avanzados están en ensayos clínicos, ya sean totalmente específicos de AXL o no, son bemcentinib (131–133,140,151,152), gilteritinib (152,153), sunitinib (154), cabozantinib (131,155) y merestinib (156,157) para el tratamiento de diferentes cánceres. No obstante, y excepto en el caso de bemcentinib, estas moléculas no actúan selectivamente en el sistema, sino que también pueden afectar a otras proteínas y cascadas de señalización, fundamentalmente a otras RTKs (28).

1.6.1 Bemcentinib

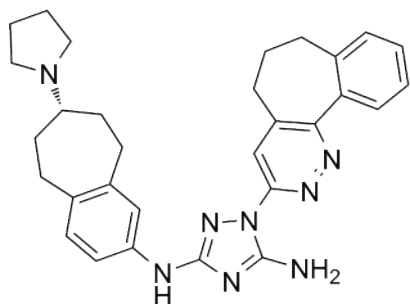


Figura 9. Estructura química del bemcentinib.

No. CAS : 1037624-75-1

En la actualidad, es el fármaco que inhibe más selectivamente la actividad catalítica de AXL respecto a otras tirosina-quinasas, incluyendo los otros receptores TAM, y actuando sobre las vías de AKT y ERK 1/2. No obstante, hay estudios que han encontrado actividad inhibidora sobre otros receptores, como FLT3 (158).

Desde su desarrollo, el inhibidor de AXL, bemcentinib (Figura 9), se está usando en abundantes estudios por multitud de grupos de investigación como una herramienta útil para entender la función de AXL a nivel molecular. Gracias a ellos, se ha demostrado, tanto a nivel *in vitro* como en modelos preclínicos *in vivo*, que el uso de este fármaco produce la inhibición de la migración e invasión por parte de las células tumorales, es capaz de contener o reprimir la angiogénesis y la metástasis, aumentando con ello la supervivencia de los animales tratados (131–133,151,152,159). Además, estos estudios han demostrado que utilizándolo se mejora la eficacia de la quimioterapia y se recupera la sensibilidad a otros fármacos, ya que como indicamos anteriormente, la sobreexpresión de AXL es un mecanismo de resistencia al tratamiento en determinados tipos de cáncer (159,160).

Por ahora, bemcentinib es el inhibidor de AXL más avanzado en investigación clínica. Concretamente tiene en marcha o completados ensayos clínicos para combatir cánceres sólidos y hematológicos, entre ellos la leucemia mieloide aguda (*Acute Myeloid Leukemia*, AML), los síndromes mielodisplásicos (*MyeloDysplastic Syndromes*, MDS), cáncer de pulmón de células no pequeñas (*Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC), el cáncer de mama, el cáncer de páncreas, melanoma y tumores cerebrales, entre otros (28). La Tabla 2 muestra los ensayos clínicos registrados que se están llevando a cabo en la actualidad según la patología a tratar, ya sea usando bemcentinib como monoterapia o en combinación con otros fármacos.

Tabla 2. Estudios clínicos que emplean bemcentinib. Se indican aquellos estudios que emplean el inhibidor de AXL registrados en clinicaltrials.gov (consultado 30/03/2022).

Código	Patrocinador	Afección	Inicio	Fase	Estado
NCT02488408	BerGenBio ASA	Leucemia mieloide aguda Síndrome mielodisplásico	01/09/14	1/2	Activo
NCT02424617	BerGenBio ASA Chiltern Int. Inc.	Carcinoma pulmonar no microcítico	01/03/15	1/2	Completado
NCT02922777	U Texas SMC Texas Tech U HSC BerGenBio ASA	Carcinoma pulmonar no microcítico	01/11/16	1	Reclutando
NCT02872259	Haukeland U Hospital BerGenBio ASA	Melanoma	13/02/17	1/2	Reclutando
NCT03184558	MSD Corp BerGenBio ASA	Cáncer de mama	26/07/17	2	Cancelado
NCT03184571	MSD Corp BerGenBio ASA	Cáncer de pulmón	17/10/17	2	Reclutando
NCT03824080	GWT-TUD GmbH G Franc. Myelod VU U Medical C BerGenBio ASA	Leucemia mieloide aguda Síndrome mielodisplásico	20/12/18	2	Completado
NCT03649321	U Texas SMC Triligent Int Trans Genom Res Inst BerGenBio ASA	Cáncer de páncreas	03/01/19	1/2	Reclutando
NCT03654833	U Leicester British Lung Found. Clovis Oncology Inc Eli Lilly Co MSD Corp BerGenBio ASA Roche Pharma AG U Hospitals, Leicester Christie NHS Trust GlaxoSmithKline	Mesotelioma maligno	28/01/19	2	Reclutando
NCT03965494	S. Kimmel at JHopkins NCI (US) BerGenBio ASA	Tumores del SNC	02/01/20	1	Reclutando
NCT04890509	BerGenBio ASA	COVID-19	20/10/20	2	Completado

Como se puede observar, la gran mayoría de estudios con bemcentinib se centran en su uso para combatir diferentes tipos de cáncer. No obstante, están en marcha ensayos preclínicos y clínicos para combatir la infección por SARS-CoV-2, causante de la COVID-19 (57).

1.7 Cáncer de páncreas

El páncreas es un órgano situado en la cavidad abdominal, detrás del estómago, y está dividido en dos compartimentos: endocrino y exocrino. La parte endocrina es la que se encarga de la homeostasis nutricional, y la exocrina, compuesta de células acinares y ductales, es la que se responsabiliza del transporte de enzimas digestivas (161).

En la actualidad, el cáncer de páncreas es uno de los cánceres más letales que existen, provocando en el mundo más de 466.000 muertes anuales (162). Tiene mayor incidencia en Europa, Norte América y Australia, en personas del sexo masculino y personas de entre 65 y 80 años de edad en el momento del diagnóstico. No se conocen medidas preventivas concretas, pero sí que se recomienda evitar los principales factores de riesgo: tabaquismo, obesidad y dieta alta en grasas. No obstante, se sabe que hay factores que contribuyen a una mayor predisposición a padecer cáncer de páncreas: historial familiar, pancreatitis crónica (*Chronic Pancreatitis, CP*), para la que, a su vez, el alcoholismo es un factor de riesgo, *diabetes mellitus*, infección por *Helicobacter pylori*, enfermedad periodontal y una dieta alta en carne y baja en verduras (163–167). Recientemente se ha demostrado que la composición de la microbiota se asocia al cáncer de páncreas, sugiriendo un papel en la etiología y el progreso de la enfermedad (168).

El motivo por el que este cáncer es tan letal es porque no se detecta hasta que no está muy avanzado, ya que comúnmente no presenta síntomas o estos son difusos (dolor abdominal, pérdida de peso y apetito). Otros síntomas como aparición de diabetes, coágulos, ictericia, hinchazón del hígado o la vesícula biliar, suelen ser raros en el inicio de la enfermedad. No se conocen biomarcadores suficientemente específicos y las lesiones preneoplásicas son muy pequeñas, lo que reduce la concentración de posibles marcadores de la enfermedad en biopsias líquidas que puedan ser analizadas. El pronóstico de la enfermedad es muy grave. La esperanza de vida es de 9 a 15 meses si el tumor está localizado y de 3 a 6 meses si se ha producido metástasis (163). De hecho, menos del 5% de los pacientes ha podido vivir hasta 5 años desde el momento del diagnóstico (163,165,169). La única oportunidad de tratamiento es la cirugía, pero lamentablemente en el 80-85% de los casos no es posible porque el cáncer está demasiado avanzado, y de los que sí se han podido operar, tienen frecuentemente complicaciones postquirúrgicas (165). Por estas razones, es primordial encontrar biomarcadores específicos y eficaces, para así poder detectar el cáncer en fases tempranas y proceder a la cirugía.

El cáncer de páncreas se divide en 2 tipos según su apariencia: sólidos y císticos. En el grupo de sólidos se incluyen el adenocarcinoma pancreático ductal (*Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma*, PDAC), los neoplasmas neuroendocrinos, los carcinomas celulares acinares y los pancreato-blastomas. En cambio, el grupo de tipo cístico se subdivide en neoplasmas papilares mucinosos, neoplasmas papilares mucinosos intraductales y neoplasmas pseudopapilares sólidos (169). Aun habiendo estos diferentes tipos y subtipos, más del 90% de los casos diagnosticados corresponden a PDAC (164,170), el cual es al que se presta atención en esta tesis.

Aunque no existe una etiología molecular definida, el estudio del cáncer de páncreas a nivel molecular ha permitido demostrar que mecanismos influyen en su aparición. Se ha detectado acortamiento de telómeros, la desregulación epigenética, como la metilación de ADN y las modificaciones de histonas, y mutaciones en oncogenes, como BRAF, MYB, AKT2 y EGFR, en supresores tumorales como MAP2K4, SIK11, TFGBR1, EP300 y FBXW7, en reguladores del ciclo celular, entre otros (163). Entre la gran multitud de genes mutados, los más comunes son *KRAS*, *BCRA1*, *BCRA2*, *CDKN2A*, *TP53* Y *PALB2*, aunque el gen *KRAS* es el que más prevalece, ya que está presente en más del 90% de los casos (171–173).

1.7.1 PDAC

El adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) afecta a la parte exocrina del órgano, que está compuesta por células acinares y ductales. Al ser el tipo de cáncer de páncreas más común, es el más estudiado. Los tumores se desarrollan en células exocrinas a partir de lesiones precursoras, que de por sí no son invasivas, pero si actúan sinérgicamente con mutaciones oncogénicas e inflamación, son un problema (161). Se han descrito tres tipos de lesiones: neoplasia intraepitelial pancreática (*PANcreatic Intraepithelial Neoplasia*, PanIN), neoplasia papilar-mucinoso intraductal (*Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm*, IPMN) y neoplasia quística mucinosa (*Mucinous Cystic Neoplasm*, MCN). Estas lesiones tienen en común la mutación en el gen *KRAS*, pero se diferencian por su tamaño, histología y las mutaciones producidas (174,175).

Las PanIN son las más comunes y las más preocupantes. Son de tamaño microscópico (<5 mm) y se dividen en tres grupos según las características morfológicas y la gravedad. Por un lado, las PanIN1 son las lesiones de menor grado y se subdivide en dos tipos: PanIN-1A y PanIN-1B. PanIN-1A tienen un epitelio mucinoso plano y PanIN-1B tienen un epitelio mucinoso papilar, ambos se caracterizan por que las células afectadas no han cambiado su forma, tamaño ni su proceso de división celular, es

decir, no existe atipia celular. Por otra parte, las PanIN-2 son de gravedad media, sí que tienen signos de atipia celular y tienen una morfología papilar. Finalmente, las PanIN-3 son de gravedad alta y corresponden a carcinoma (175,176).

Al contrario que las PanIN, las IPMN y MCN se caracterizan por la producción de mucina y tienen un tamaño macroscópico, por lo que sí que es posible detectarlas por radiografía. También, tienen mutaciones para la inactivación de p53 y p16, y para la pérdida de SMAD4, además de las típicas mutaciones en *KRAS* (175,176).

En 2008, el grupo de Siân Jones, analizó 24 exomas de tumores PDAC humanos para determinar los genes alterados en estos pacientes. Los resultados que obtuvieron fueron que, de los 23219 transcritos analizados, había una media de 63 alteraciones genéticas, de las cuales la mayoría eran mutaciones puntuales. En la Tabla 3 se encuentran recogidas las mutaciones encontradas en este estudio y los procesos moleculares que están afectados por ellas (171).

Tabla 3. Selección de genes mutados en tumores PDAC. Se indican los genes mutados en 24 tumores clasificados según el proceso regulatorio o vía de señalización a la que afecta. La información de la tabla está modificada del artículo del grupo de Jones et al (171). Los genes más frecuentemente mutados se indican según la revisión de Connor et al (177).

Proceso regulatorio/vía de señalización	Genes alterados
Apoptosis	CASP10, VCP, CAD, HIP1
Control del daño ADN	ERCC4, ERCC6, EP300, RANBP2, TP53 (80%)
Regulación de la transición fases G1/S	CDKN2A (60%), FBXW7, CHD1, APC2
Señalización Hedgehog	TBX5, SOX3, LRP2, GL11, GL13, BOC, BMPR2, CREBBP
Adhesión celular homofílica	CDH1, CDH2, CDH7, CDH10, FAT, PCDH15, PCDH17, PCDH18, PCDH19, PCDHB16, PCDH2, PCDHGA1, PCDHGA11, PCDHGC4
Señalización de integrinas	ITGA4, ITGA9, ITGA11, LAMA1, LAMA4, LAMA5, FN1, ILK
Señalización de quinasa c-Jun	MAP4K3, TNF, ATF2, NFATC3
Señalización KRAS	KRAS (90%), MAP2K4, RASGRP3
Regulación de la invasión	ADAM11, ADAM12, ADAM19, ADAM5220, ADAMTS15, DPP6, MEP1A, PCSK6, APG4A, PRSS23
Señalización dependiente de GTPasas	AGHGEF7, ARHGEF9, CDC42BPA, DEPDC2, PLCB3, PLCB4, RP1, PLXNB1, PRKCG
Señalización TGFβ	TGFBR2, BMPR2, SMAD4 (40%), SMAD3
Señalización Wnt/Notch	MYC, PP2R3A, WNT9A, MAP2, TSC2, GATA6, TCF4

Estudios posteriores al del grupo de Jones, mediante el análisis genómico de centenares de muestras más, han podido identificar más exhaustivamente las mutaciones producidas en tumores PDAC. En base a estos resultados, se ha hecho una clasificación de PDAC según sus características epigenéticas. El primer grupo establecido es el tipo clásico/progenitor, el cual destaca porque son tumores bien

diferenciados. Por otra parte, el segundo grupo de PDAC es el tipo escamoso/basal, el cual no está bien diferenciado y es el que peor pronóstico tiene (178–181).

Los resultados obtenidos gracias al análisis mutagénico pueden indicar no solamente los genes oncogénicos alterados, sino también qué vías pueden participar en la transformación tumoral y ser las responsables del desarrollo del tumor pancreático. Asimismo, las vías de señalización que participan son las de RTKs, JNK, TGF β , Wnt, SHH y Notch. La activación de estas vías resulta en la activación de factores de transcripción, como NF κ B, c-Jun, c-Myc y p53, los cuales favorecen la invasión y migración celular, resistencia a fármacos y quimioterapia, angiogénesis por inducción de EMT y la proliferación celular. Este conocimiento molecular permite proponer y desarrollar fármacos experimentales que tengan como diana estas vías (172,182,183).

1.7.1.1 Señalización de la vía KRAS

La subfamilia de proteínas RAS (de *RAt Sarcoma virus*), producidas por los oncogenes *HRAS*, *KRAS* y *NRAS*, y que comprende más de 30 genes en humanos, son proteínas G monoméricas y están presentes en la cara interna de la membrana plasmática (184). Su actividad está regulada por proteínas guanósín di- y tri-fosfato (GDP y GTP, respectivamente). Concretamente, las RAS están activadas cuando están unidas a GTP e inactivadas cuando están unidas a GDP. Las proteínas responsables de la activación y desactivación de RAS son los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (*Guanine nucleotide exchange factor*, GEF) y las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (*GTPase-activating protein*, GAP). Las proteínas RAS son participantes clave en procesos de señalización mitogénica y de proliferación celular, por lo que su actividad debe ser estrechamente controlada (185).

En las células tumorales son comunes las mutaciones en el gen *RAS*, las cuales son las más comunes, produciendo una sobreactivación incontrolada de la actividad de la proteína RAS, en las que GEFs no tienen ningún efecto regulador. K-RAS se ha visto frecuentemente mutado en cáncer de pulmón, colorectal y páncreas, N-RAS en leucemias agudas y H-RAS en cáncer de vejiga, próstata y tiroides (185).

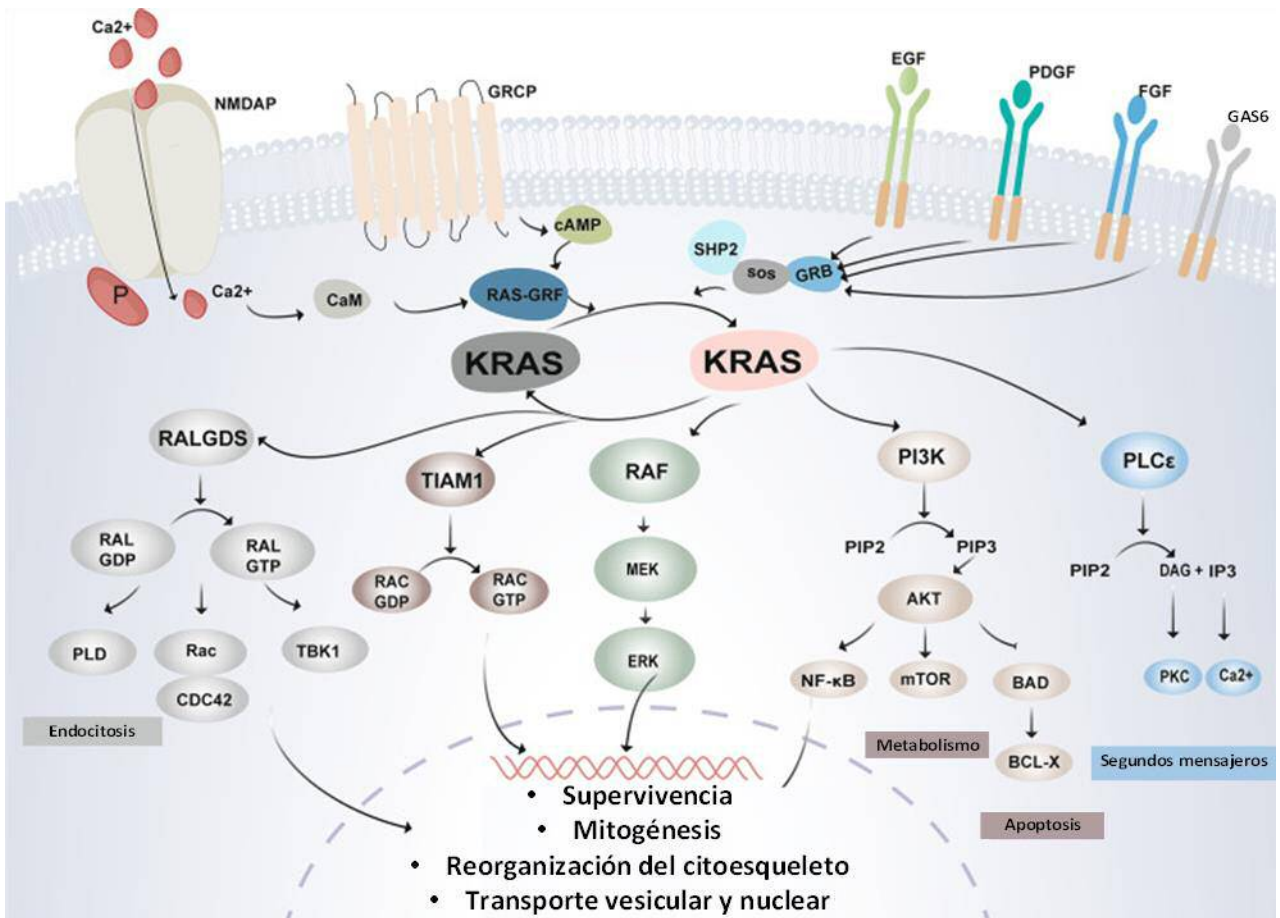


Figura 10. Vías de señalización activadas por KRAS. La activación canónica de la vía de RAS depende de su localización adyacente a receptores de membrana (como RTKs). En reposo, las proteínas RAS están unidas a GDP. Cuando factores de crecimiento interactúan con sus receptores, las GEFs (como SOS) liberan GDP y lo intercambian por GTP, activando RAS. Otras proteínas, los GAPs aceleran la catálisis de GTP volviendo a la forma en reposo. RAS-GTP activa la vía de las MAPKs controlando la proliferación celular, la vía antiapoptótica de AKT y otras vías pro-mitogénicas y que regulan la arquitectura celular y la endocitosis. Modificado de (185).

Cómo hemos indicado anteriormente, en el caso de PDAC, más del 90% de los cánceres contienen mutaciones en *K-RAS* (171,172). Por este motivo, el modelo de ratones *K-Ras* es el más utilizado para la investigación de PDAC, ya sea para entender los mecanismos moleculares asociados como para la búsqueda de posibles inhibidores terapéuticos (186–189). Este modelo desarrolla lesiones tumorales en el páncreas que derivan en adenocarcinomas malignos, con una patología equivalente a la que se observa en PDAC humano.

1.7.1.2 Papel del sistema GAS6/AXL en el desarrollo de PDAC

Los componentes del sistema GAS6/AXL se han visto aumentados en pacientes que padecen PDAC, ya sea en inmunohistoquímica de tejidos como en líneas celulares derivadas de estos pacientes PDAC (190,191). Esto refuerza la idea que estas proteínas tienen un rol en el desarrollo de esta patología.

Dada la implicación de las RTKs en la proliferación de las células tumorales y los datos de expresión de AXL en PDAC, estudios iniciales propusieron la terapia contra AXL en PDAC. En efecto, anticuerpos monoclonales contra AXL inhibían la vía de AKT y provocaban la internalización de AXL en células de PDAC, disminuyendo su migración y proliferación. Esto se traducía en un menor crecimiento del tumor en modelos ortotópicos (192). Además, el efecto era independiente de la presencia o no de mutaciones en *KRAS* (192). Un efecto similar se obtuvo cuando la inhibición de la vía se realizó a través de la inhibición indirecta del ligando GAS6 por la eliminación de residuos Gla en la molécula mediante el empleo de anticoagulantes orales que inhiben la vitamina K [Warfarina; (193)]. GAS6, por tanto, actuaría activando la vía de AXL y promoviendo la metástasis. Además, la producción de GAS6 en macrófagos, neutrófilos y fibroblastos del estroma tumoral inhibe la activación de la inmunidad innata en el microambiente tumoral y la activación de NKs, disminuyendo el control inmunológico sobre el PDAC (194,195).

El evento más importante en el que GAS6/TAM puede ejercer una gran influencia es en el proceso EMT. Esto se ha podido comprobar empleando ratones *knockout* para *Axl*. En estos animales, la inducción de PDAC produce tumores menos graves, ya que son de una histología más diferenciada (194). En el mismo estudio, los tumores humanos positivos para AXL son menos diferenciados y con mayor potencial metastático. Por ello, podría ser un buen candidato como diana para el uso terapéutico de esta patología (16,196,197).

1.8 Coronavirus

La familia de virus llamada *Coronaviridae* se caracteriza por tener ARN monocatenario positivo como material genético, el cual es muy susceptible a recombinaciones y mutaciones (198). Este tipo de virus tienen el genoma más largo entre los virus de ARN, entre 27 y 32 kb, y son capaces de infectar a mamíferos y aves, causando patologías a nivel respiratorio, gastrointestinal y del sistema nervioso central en humanos (199,200).

Existen diferentes tipos de coronavirus: alfa, beta, gamma y delta, con sus respectivos subtipos. Se cree que el origen de estos virus ocurre en mamíferos, como el murciélago (201,202). Los más conocidos son los causantes del resfriado común, descritos en los años 60 y que son responsables de entre el 10 y el 15% de los resfriados comunes, el virus del síndrome respiratorio agudo grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS-CoV) y el virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (*Middle East Respiratory syndrome*, MERS-CoV), pertenecientes en su mayoría al grupo de beta-coronavirus (199). Dentro de los SARS-CoV se encuentran SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2. El motivo por el que son importantes es porque SARS-CoV-1, causó la epidemia SARS en 2002, MERS-CoV provocó una epidemia en 2012, y SARS-CoV-2 está causando una pandemia desde 2019 (199,200).

1.8.1 COVID-19

Las proteínas que codifica SARS-CoV-2, en el cual se centra esta tesis, comparte 94.6% de homología en la secuencia de aminoácidos con SARS-CoV-1. De hecho, pertenecen al mismo género (*betacoronavirus*) y subgénero (*Sarbecovirus*). Ambos utilizan la enzima convertidora de angiotensina 2 (*Angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) de la célula huésped para poder infectar, aunque SARS-CoV-2 tiene mayor afinidad que SARS-CoV-1 por esta proteína de membrana (199,202).

La COVID-19 se detectó por primera vez en un paciente con neumonía en diciembre de 2019 en Wuhan, China. La causa, por ahora, es desconocida, pero se sospecha que fue por carne contaminada en un mercado de esta ciudad. Desde ahí fue esparciéndose al resto de países del mundo y el 11 de marzo de 2020 fue declarada como pandemia mundial por la Organización Mundial de la Salud. Tiene un alto índice de infectividad y es muy susceptible a nuevas mutaciones, dando lugar a diferentes cepas. Solamente en el año 2021 se confirmó oficialmente que provocó 94 millones de infecciones y 2 millones de muertes. Se calcula que desde su inicio la pandemia ha causado globalmente entre 14 y 25 millones de muertes adicionales [<https://www.economist.com/graphic-detail/coronavirus-excess-deaths-estimates> (consultado 29/03/2022)], lo que ha supuesto una crisis tanto sanitaria como económica (199,200,202).

Esta patología se caracteriza por afectar a múltiples sistemas, como el respiratorio, gastrointestinal, musculo-esquelético y neurológico. Los síntomas más comunes son tos, dolor de pecho y congestión nasal. No obstante, también hay muchos casos que presentan diarrea, vómitos y dolor abdominal. Esta variabilidad sintomática puede deberse en parte a que el virus infecta a través de la

metalo-carboxipeptidasa ACE2, la cual está presente en multitud de tipos celulares de diferentes tejidos, como células endoteliales, neumocitos tipo 2 y enterocitos (199,202,203).

Otros problemas añadidos a esta patología son que la COVID-19 puede presentarse en coinfecciones de SARS-CoV-2 con otros patógenos, como las bacterias *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, entre otros. La infección con el virus aumenta notablemente la predisposición a una posterior infección por estas bacterias y puede presentar síntomas persistentes, aunque la infección haya remitido. Esto es debido al daño multiorgánico y los efectos sobre el sistema inmunitario, lo que agrava el pronóstico del paciente (204–206).

1.8.2 Estructura de SARS-CoV-2

Por lo que refiere a la estructura del virus, se compone de 4 regiones: la nucleocápside, donde se sitúa el genoma, y tres tipos de proteínas estructurales que la rodean, las de membrana, envoltura y la espícula característica de los coronavirus (proteína *Spike*; Figura 11). Las proteínas de membrana y envoltura son las encargadas de sostener la estructura del virión, mientras que la proteína *Spike* es la responsable de la entrada del virus a la célula huésped (200). En más detalle, el genoma ribonucleico de SARS-CoV-2 se compone de 10 marcos de lectura abierta. Más de un 30% del ARN codifica para proteínas estructurales, y el restante codifica para proteínas no estructurales (207).

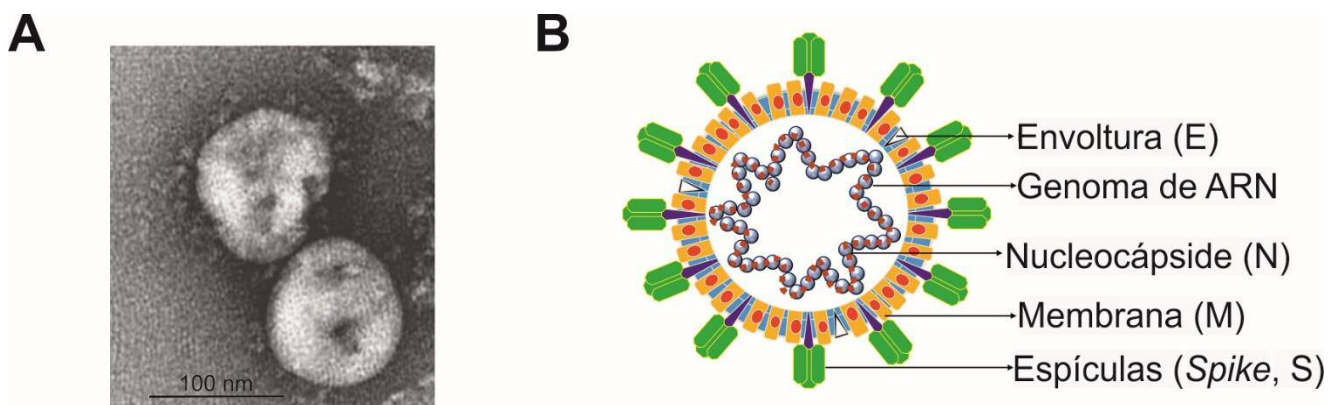


Figura 11. Estructura de SARS-CoV-2. (A) Primera visualización de la ultraestructura de virus de “2019-nCoV” por microscopía electrónica de transmisión. Partículas del virus teñidas negativamente. Se observa las características espículas en la envoltura vírica que caracterizan a los coronavirus [obtenido de (208)]. (B). Una estructura típica de los coronavirus, con la localización de las diferentes proteínas que lo componen (S, M, E) y el ARN que conforma el genoma empaquetado por la proteína N [modificado de (209)].

La proteína *Spike* es el centro de atención para la estrategia vacunal y de prevención, ya que, sin ella, el virus no sería capaz de infectar y se conoce que es la proteína más inmunogénica en este grupo de

virus. Es una glicoproteína en forma de homotrímero, también llamada peplómero, que está presente en múltiples copias a lo largo de la membrana, lo que recuerda a la forma de una corona. Se compone de varias regiones: un ectodominio, una región transmembrana y una intracelular (199,207). Lo que genera más interés son las regiones S1 y S2 del ectodominio. La subunidad S1 es la que se une a ACE2 y la S2 es la que permite la unión entre el virión y la membrana de la célula huésped mediante la proteasa de serina transmembranal tipo 2 (*Trans-Membrane PRotease Serine 2*, TMPRSS2), furina, tripsina y catepsinas (210,211).

1.8.3 Mecanismo de entrada vírica

Para la unión del virus con una célula humana, es necesario que el dominio de unión al receptor de la subunidad S1 de la proteína *Spike* se una con ACE2. Esta unión provoca un cambio conformacional en ambas subunidades de la *Spike*, exponiendo la región S2' de la subunidad S2, por donde la proteasa TMPRSS2, situada en la membrana plasmática, se escinde. Seguidamente la subunidad S2, la cual contiene un péptido de fusión y más maquinaria de anclaje, se extiende y se une a la membrana celular. Esto provoca que la subunidad S2 se pliegue sobre sí misma, acercando el virión íntimamente a la membrana celular, se acabe formando un poro y se introduzca el ARN viral al citoplasma celular por endocitosis mediada por clatrina. Aunque posiblemente este es el mecanismo principal de infección celular en este virus, algunos estudios indican que puede penetrar de formas alternativas (211–214).

1.8.4 ACE2 y ADAM17

La entrada del virus, por la unión de la *Spike* a ACE2, supone la internalización y, por tanto, la inhibición de la funcionalidad de ACE2, limitando su acción reguladora sobre el sistema renina/angiotensina y provocando una acumulación de angiotensina II. Este suceso supone una complicación en la patología de la infección viral, ya que este sistema es importante para la regulación de la presión sanguínea, el equilibrio electrolítico y la resistencia vascular, y su disfunción induce procesos de fibrosis, hipertrofia, y aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Entre otros mecanismos proinflamatorios, el acúmulo de angiotensina II como consecuencia de la reducción de la actividad ACE2 puede aumentar la inflamación y muerte celular en los alveolos pulmonares, reduciendo su funcionalidad (142,215).

Una enzima que participa en el efecto de SARS-CoV-2 sobre el sistema renina/angiotensina es ADAM17, la cual interviene también en la funcionalidad de los receptores TAM (ver 1.5). Esta

metaloproteinasa es capaz de escindir ACE2, y se activa por la endocitosis de las proteínas *Spike*. Por otro lado, la acumulación de angiotensina II por la disminución de la actividad ACE2 provoca la activación de AT1R, que a su vez activa ADAM17, retroalimentando el sistema (216). El efecto final aumenta la inflamación ya que otro de los sustratos de ADAM17 es el precursor de TNF. Una vez liberado, el TNF extracelular se une a su receptor, TNFR, activando su cascada de señalización y provocando la liberación de más citoquinas proinflamatorias (215). La importancia de ADAM17 en los mecanismos patológicos inducidos por SARS-CoV-2 (Figura 12) se refleja en sus niveles plasmáticos, porque se ha visto que pacientes de COVID-19 tienen niveles elevados en suero y que estos correlacionan con la severidad de la enfermedad (217). Por ello, se ha propuesto que moléculas recombinantes de ACE2 similares para disminuir la concentración de angiotensina II y revertir el efecto de los coronavirus sobre el sistema renina/angiotensina (215).

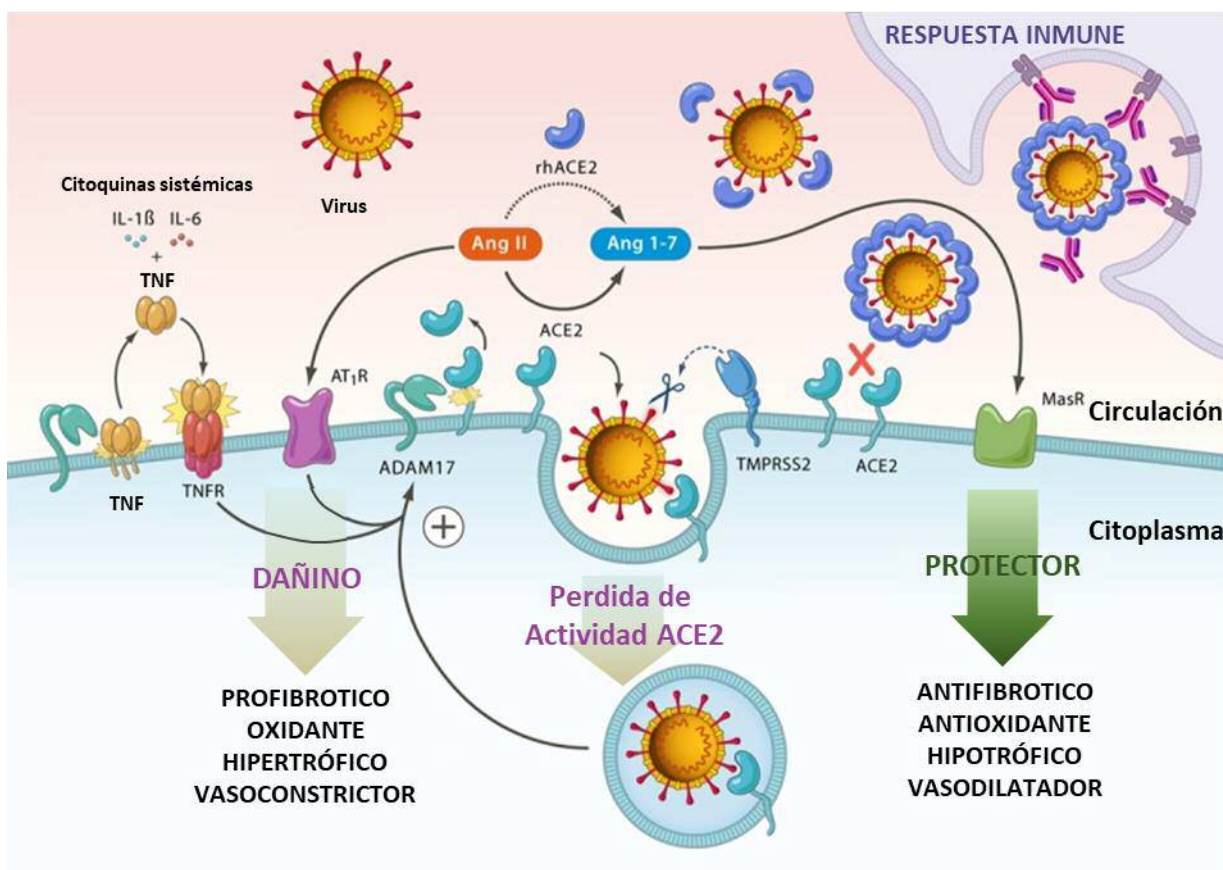


Figura 12. Implicación de ADAM17 y ACE2 en el mecanismo de entrada de SARS-CoV-2 a la célula huésped. La función protectora de ACE2 desaparece cuando el virus lo emplea para infectar la célula por su endocitosis. Los niveles de angiotensina II aumentan, al no proteolizarse a angiotensina 1-7 (azul). Angiotensina II (naranja) es un vasoconstrictor que además tiene efectos profibróticos, y pro-oxidante, La presencia de ADAM17 en la membrana se estimula por la

infección por SARS-CoV-2 y por angiotensina II. Esto aumenta la inflamación (liberación de TNF). El empleo de ACE2 recombinante (rhACE2) puede ser una estrategia terapéutica en este contexto. Modificado a partir de (215).

1.8.5 Respuesta inmunitaria a SARS-CoV-2

Una vez el material genético vírico se ha introducido en la célula huésped, es reconocido por TLR3, TLR7, TLR8 y RIG-1, receptor de reconocimiento de patrones citosólicos responsable de la respuesta de interferón tipo 1. La activación de estos receptores supone la estimulación de la vía de NFκB y de IRF3/7, para así aumentar la producción de IFN γ y citoquinas proinflamatorias (218). Finalmente, hay un aumento de la piroptosis y de la estimulación de células inmunitarias por la presencia de DAMPs y PAMPs. Todo esto concluye en una inflamación drástica por la producción de una tormenta de citoquinas, como IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, TNF y MIP1 α , provocando un fallo multiorgánico y choque séptico en el paciente (199,218). Si esta situación no es resuelta por mecanismos del propio organismo o controlada médicamente, puede producir la muerte del paciente.

1.8.6 Papel de GAS6/TAM en COVID-19

Aunque se asume que el principal punto de anclaje de los coronavirus del SARS a la membrana de la célula huésped es el receptor ACE2, se cree que existen otras moléculas de membrana que pueden facilitar la entrada del virus. Entre ellas, varios grupos de investigación apoyan que AXL puede actuar como correceptor, siendo junto a ACE2, la llave de entrada del virus (57,139,219). GAS6 reconoce las PtdSer de la envoltura del virus y actúa como opsonina, uniéndose a AXL, presente en la membrana de las APC (139). Esta unión provoca la activación de AXL, el cual estimula la reorganización del citoesqueleto, facilitando la endocitosis del virus y su posterior replicación. Aunque esto permite la infección vírica, al facilitar la endocitosis del virus por parte de las APC se inicia también la respuesta inmunitaria contra el mismo (115). El papel de AXL en la infección por coronavirus como SARS-CoV-2 puede ser importante, ya que AXL está significativamente más expresado en las células de los epitelios del tracto respiratorio que ACE2. Además, se ha propuesto que la infección con SARS-CoV-2 induce la expresión de varios genes mesenquimales, entre ellos AXL (220). Este aumento de la expresión de AXL produce una sobreactivación de su vía de señalización, lo que potencia los efectos del mecanismo regulador de las vías proinflamatorias de los TLRs e IFN que se describieron en la sección 1.4.1, con SOCS 1 y SOCS3 como intermediarios (46,115). De esta manera, la participación del sistema GAS6/TAM en la infección podría ser importante en la regulación de la tormenta de citoquinas característica de la COVID-19 (218).

El endotelio dañado provoca un aumento de la secreción de GAS6, lo que a su vez estimula la producción de moléculas de adhesión, como ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina. Esta producción hace que plaquetas, leucocitos y neutrófilos sean reclutados en la región dañada (66). El reclutamiento de estas células a los lugares de inflamación, y su activación mutua, son una de las causas de la formación de coágulos en el pulmón inducidos por la infección (inmunotrombosis), los cuales pueden empeorar el curso de la enfermedad en el paciente (46,115).

Por último, los niveles elevados de ADAM17 en pacientes infectados con SARS-CoV-2 (217), además de disminuir la actividad de ACE2 (216), tienen como consecuencia la regulación negativa del sistema GAS6/TAM.

OBJETIVOS

2. Objetivos

A lo largo de la introducción hemos podido ver el rol que ejercen los miembros de la familia TAM y sus ligandos en cáncer general, en cáncer de páncreas, en varias infecciones víricas y su posible papel en la COVID-19. No obstante, GAS6 y los receptores TAM, al estar ampliamente expresados en múltiples tipos celulares y tejidos (Figura 1), y dado su papel en la regulación de sistemas de respuesta a daño como la inmunidad innata y la coagulación, es lógico pensar que también tienen un papel importante en otras enfermedades humanas.

Multitud de estudios han demostrado el papel que tienen estas proteínas en patologías caracterizadas por eventos autoinmunes, fibróticos e inflamatorios (123,221–223). Cabe mencionar que gracias al análisis de GAS6 y TAMs en sangre y otros fluidos, se ha podido proponer que estas proteínas intervienen en el desarrollo de diversas patologías. Por ejemplo, pacientes con SLE tienen los niveles de GAS6 disminuidos y los de AXL aumentados en plasma, mientras que los que han sido diagnosticados con artritis reumatoide tienen tanto GAS6 como AXL disminuidos y los que padecen sepsis tienen ambos niveles aumentados en fases específicas de la enfermedad. Las concentraciones de las proteínas del sistema GAS6/TAM en muestras biológicas están siendo ampliamente estudiados en enfermedades cardiovasculares (222), incluyendo la insuficiencia cardíaca (224,225), enfermedades autoinmunes, como SLE (226,227), artritis reumatoide (228), y esclerosis múltiple (229), enfermedades hepáticas como la esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica (71,230), y enfermedades infecciosas que se complican en sepsis (123). Por ello, el conocimiento del sistema GAS6/TAM junto a otros sistemas moleculares, podría ayudar al desarrollo de estrategias que ayuden a la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de patologías humanas.

Por ello, en esta tesis nos propusimos:

Correlacionar los niveles de GAS6 y las formas solubles de los receptores TAM (sAXL y sMERTK) con la detección precoz y pronóstico de patologías humanas, como cáncer de páncreas y COVID-19.

Asimismo, como objetivo secundario, queremos explorar el uso de moduladores del sistema GAS6/TAM como dianas moleculares para aplicaciones terapéuticas en dichas patologías.

RESULTADOS

3. Resultados

Los resultados obtenidos durante esta tesis se presentan mediante dos publicaciones.

3.1 Informe de los directores.



Barcelona, 6 d'Abril de 2022

La tesi de la doctoranda Helena Cristóbal Valero es presenta en format per articles i conté dues publicacions (EBioMedicine 2022, factor d'impacte 8.143, Q1; i Biomedicines 2021, factor d'impacte 6.081, Q1) de les que la doctoranda es primera (BioMedicine) i tercera autora (Biomedicines), i que no han estat utilitzades en cap altre tesi doctoral.

1) Martínez-Bosch N*, Cristóbal H*, Iglesias M, Gironella M, Barranco L, Visa L, Calafato D, Jiménez-Parrado S, Earl J, Carrato A, Manero-Rupérez N, Moreno M, Morales A, Guerra C, Navarro P, García de Frutos P. Soluble AXL is a novel blood marker for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma and differential diagnosis from chronic pancreatitis. EBioMedicine. 2022 Jan;75:103797. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103797. Epub 2021 Dec 29. PMID: 34973624; PMCID: PMC8724936.

La doctoranda Helena Cristóbal es primera signant i co-principal responsable de la feina que conté. Gràcies a ella, hem pogut identificar la molècula AXL soluble com un potencial biomarcador de l'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC), el principal tumor de pàncrees que ens afecta a nivell mundial, assenyalant el seu possible ús pel diagnòstic precoç i diferencial. La doctoranda va participar tant en la obtenció dels resultats experimentals, amb la realització d'anàlisis de ELISA, western blot o immunohistoquímica, com en l'anàlisi posterior dels resultats obtinguts, ajudant en gran manera en la seva bona publicació.

2) Morales A, Rojo Rello S, Cristóbal H, Fiz-López A, Arribas E, Mari M, Tutusaus A, de la Cal-Sabater P, Nicolaes GAF, Ortiz-Pérez JT, Bernardo D, García de Frutos P. Growth Arrest-Specific Factor 6 (GAS6) Is Increased in COVID-19 Patients and Predicts Clinical Outcome. Biomedicines. 2021 Mar 26;9(4):335. doi: 10.3390/biomedicines9040335. PMID: 33810394; PMCID: PMC8065652.

La doctoranda Helena Cristóbal és tercera signant d'aquesta publicació. La seva col·laboració va ser imprescindible per la obtenció dels resultats que senyalen a GAS6 com una molècula indicadora de la infecció per SARS-COV2 i biomarcadora de la seva virulència. La doctoranda va realitzar determinacions de GAS6 i els receptors TAM durant la seva realització i va contribuir a la determinació de les citocines generades pels macròfags com a diana terapèutica potencial dels inhibidors TAM.

En resum, la feina desenvolupada per la doctoranda Helena Cristóbal ha contribuït a caracteritzar el paper de la via GAS6/TAM en dos patologies amb un impacte clínic molt rellevant, com els tumors de pàncrees i la COVID-19, i ha obert la porta al futur ús de GAS6 y AXL com a biomarcadors que ajudin al diagnòstic i seguiment d'aquestes dos malalties. Per tot això, considerem que l'aportació científica de la doctoranda Helena Cristóbal Valero és molt rellevant i aconsellem que es procedeixi al dipòsit de la seva tesi doctoral.

Dr. Pablo García de Frutos, codirector

Dr. Albert Morales Muñoz, codirector

3.2 Resultados. Artículo 1

Martínez-Bosch N*, Cristóbal H*, Iglesias M, Gironella M, Barranco L, Visa L, Calafato D, Jiménez-Parrado S, Earl J, Carrato A, Manero-Rupérez N, Moreno M, Morales A, Guerra C, Navarro P, García de Frutos P. **Soluble AXL is a novel blood marker for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma and differential diagnosis from chronic pancreatitis.** EBioMedicine. 2022 Jan;75:103797. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103797. Epub 2021 Dec 29. PMID: 34973624; PMCID: PMC8724936.

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es uno de los tumores más agresivos que existen y es el que tiene una mayor tasa de mortalidad, siendo la tercera causa de muerte por cáncer en Europa y países desarrollados. Esto se debe a que se diagnostica en estados muy avanzados y ya no da tiempo a operar. Por ello, es importante el uso de un biomarcador capaz de hacer un diagnóstico precoz y diferencial.

Este estudio hace referencia al posible papel de AXL no solo como biomarcador para fases tempranas del cáncer, sino también para la diferenciación entre PDAC y Pancreatitis Crónica (PC). Para ello, se han utilizado varios enfoques metodológicos.

En primer lugar, examinamos histológicamente la expresión de AXL en muestras de tumores de páncreas y en condiciones patológicas asociadas con un alto riesgo a desarrollar PDAC, como PC o lesiones preneoplásicas: neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN) y neoplasias mucinosas papilares intraductales (IPMN).

Como resultados, no hubo ninguna expresión de AXL en páncreas sanos y una ligera expresión en las muestras con PC. Por otro lado, sí observamos una expresión más fuerte en las muestras con lesiones IPMN y PDAC. Aunque la expresión en los tumores fue heterogénea, podemos concluir que hay una sobreexpresión en muestras cancerosas y no en aquellas con actividad inflamatoria como las de PC.

En segundo lugar, usamos un análisis de expresión génica de AXL de bases de datos públicas. Para los 179 tejidos de PDAC usamos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y para los 171 tejidos pancreáticos sanos *Genotype-Tissue Expression* (GTEx). Subdividimos en dos grupos según la genómica reciente del cáncer: clásico/progenitor y escamoso/basal. Esto resultó en una sobreexpresión de AXL en la mayoría de muestras PDAC, y los tumores pancreáticos de tipo escamoso son los que más expresan comparándolo con los controles.

En tercer lugar, analizamos la expresión de AXL en líneas celulares de cáncer de páncreas humano establecidas: SKPC, PANC-1, Hs766T, RWP-1 y Capan-1. Los extractos celulares se analizaron por Western Blot, los cuales mostraron la presencia de AXL con una doble banda sobre los 130 kDa, siendo la mayor expresión en la línea de SK-PC1. Obtuvimos el mismo patrón de expresión a nivel de ARN mensajero. Además, medimos la concentración de AXL soluble (sAXL) mediante la técnica de ELISA en el medio de cultivo de las células, cuyos resultados concordaron con los resultados anteriores de AXL total.

Por cuarto lugar, realizamos una cuantificación de GAS6 y sAXL por ELISA de plasmas humanos control, con PDAC y PC. Analizamos dos cohortes independientes, una de 59 pacientes procedente del Hospital del Mar (HMar) y otra de 142 procedente del Hospital Clínic (HClínic). Obtuvimos como resultados que los pacientes con PDAC tenían los niveles aumentados de AXL respecto a los pacientes sanos y a los que tienen PC en ambas cohortes. Por lo que refiere a GAS6, vimos que los niveles están también aumentados en pacientes con PDAC, aunque sin diferencias significativas entre CP y PDAC en el grupo de HMar, pero sí en HClínic.

Para ver si los niveles de AXL y GAS6 se relacionan con la progresión de PDAC, clasificamos estas mismas muestras de plasma de pacientes según la etapa clínica y las comparamos con los controles, para ambas cohortes independientes. Encontramos que los niveles de AXL están aumentados en los estadios iniciales de la enfermedad, lo que va en concordancia con los datos de la base de datos TCGA, y que además se correlacionaban con la supervivencia del paciente. Es decir, a mayor concentración de AXL en plasma, menor es la supervivencia. Estos resultados sugieren que sAXL podría ser un biomarcador no invasivo para el diagnóstico de PDAC y que la expresión de ARN podría predecir el pronóstico del paciente.

Asimismo, hicimos unos modelos de regresión logística univariable o multivariable para evaluar el valor diagnóstico de sAXL y GAS6 solos o conjuntamente con CA19-9, un marcador bien reconocido del cáncer del páncreas. Como resultados, CA19-9 era significativamente más elevado en PDAC y PC respecto a los controles, aunque no distinguía entre PDAC y PC, cosa que AXL sí. En base a estos resultados, proponemos la combinación de AXL y CA19-9 (y posiblemente GAS6) para aumentar la precisión diagnóstica para uso clínico, sobre todo para el diagnóstico diferencial entre PDAC y PC.

Igualmente, analizamos muestras de personas de riesgo, predispuestas a padecer PDAC por cáncer de páncreas hereditario o familiar (H/FPC). Nuestros resultados mostraron que los niveles de sAXL se

mantienen estables en personas de alto riesgo que no habían desarrollado PDAC. Todo esto refuerza nuestra propuesta del uso de AXL para detectar el avance de esta patología.

En último lugar, utilizamos modelos de ratón bien descritos para el cáncer de páncreas. Por una parte, usamos el modelo Ela-KrasG12Vp53lox/lox (KRAS), el cual expresa el oncogén KRAS mutado en G12V bajo el promotor de elastasa específico del páncreas y tiene una depleción homocigótica del gen p53. Este tipo de ratones desarrollan lesiones preneoplásicas precursoras, PanIN, que progresan a PDAC a los 3-4 meses de edad. Por otro lado, usamos también el modelo de ratón Ela-1-myc (c-MYC), los cuales sobrexpresan el oncogén c-MYC bajo el promotor de la elastasa y desarrollan tumores pancreáticos entre los 3-6 meses de edad.

Recogimos muestras de plasma y después de su sacrificio, analizamos histológicamente los páncreas para detectar la presencia de lesiones precursoras y/o adenocarcinomas. Después de la medición de sAXL y GAS6 por ELISA, vimos que la expresión de AXL era elevada en los adenocarcinomas ductales, mientras que se detectó ligeramente en las lesiones precursoras del modelo KRAS. En cambio, los tumores acinares de los ratones c-MYC no presentaban niveles altos de AXL ni GAS6. Gracias a estos modelos de ratón, vimos que los niveles de sAXL y GAS6 estaban elevados en plasma cuando se presentan adenocarcinomas ductales, pero no cuando hay lesiones precursoras o tumores acinares.

Como conclusión, podemos decir que AXL puede ser un buen biomarcador para el diagnóstico temprano y pronóstico de PDAC, siendo capaz de diferenciarlo de PC. Para ello, proponemos el uso de un panel conjuntamente con CA19-9 y GAS6.



Soluble AXL is a novel blood marker for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma and differential diagnosis from chronic pancreatitis

Neus Martínez-Bosch,^{a,¶} Helena Cristóbal,^{b,¶} Mar Iglesias,^c Meritxell Gironella,^d Luis Barranco,^{a,e} Laura Visa,^f Domenico Calafato,^b Silvia Jiménez-Parrado,^g Julie Earl,^h Alfredo Carrato,^h Noemí Manero-Rupérez,^a Mireia Moreno,^a Albert Morales,ⁱ Carmen Guerra,^g Pilar Navarro,^{a,b,*} and Pablo García de Frutos^{j,*}

^aCancer Research Program, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Unidad Asociada IIBB-CSIC, Barcelona, Spain

^bDepartment of Cell Death and Proliferation, Institute of Biomedical Research of Barcelona (IIBB)-CSIC and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^cDepartment of Pathology, Autonomous University of Barcelona, Hospital del Mar, Centro de Investigación Biomédica en Red de Oncología (CIBERONC), Barcelona, Spain

^dGastrointestinal & Pancreatic Oncology Group, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD); Hospital Clínic of Barcelona and IDIBAPS; Barcelona, Spain

^eDepartment of Gastroenterology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

^fDepartment of Medical Oncology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

^gMolecular Oncology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain

^hMolecular Epidemiology and Predictive Tumour Markers Group, Medical Oncology Research Laboratory, Ramón y Cajal Health Research Institute (IRYCIS), Madrid, Spain. CIBERONC

ⁱDepartment of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group, Liver Unit, Hospital Clínic, CIBEREHD and IDIBAPS, Barcelona, Spain

^jDepartment of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, Unidad Asociada IMIM/IIBB-CSIC; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), and IDIBAPS, Barcelona, Spain

Summary

Background Early diagnosis is crucial for patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The AXL receptor tyrosine kinase is proteolytically processed releasing a soluble form (sAXL) into the blood stream. Here we explore the use of sAXL as a biomarker for PDAC.

Methods AXL was analysed by immunohistochemistry in human pancreatic tissue samples. RNA expression analysis was performed using TCGA/GTEX databases. The plasma concentrations of sAXL, its ligand GAS6, and CA19-9 were studied in two independent cohorts, the HMar cohort (n = 59) and the HClinic cohort (n = 142), including healthy controls, chronic pancreatitis (CP) or PDAC patients, and in a familial PDAC cohort (n = 68). AXL expression and sAXL release were studied in PDAC cell lines and murine models.

Findings AXL is increased in PDAC and precursor lesions as compared to CP or controls. sAXL determined in plasma from two independent cohorts was significantly increased in the PDAC group as compared to healthy controls or CP patients. Patients with high levels of AXL have a lower overall survival. ROC analysis of the plasma levels of sAXL, GAS6, or CA19-9 in our cohorts revealed that sAXL outperformed CA19-9 for discriminating between CP and PDAC. Using both sAXL and CA19-9 increased the diagnostic value. These results were validated in murine models, showing increased sAXL specifically in animals developing PDAC but not those with precursor lesions or acinar tumours.

Interpretation sAXL appears as a biomarker for early detection of PDAC and PDAC–CP discrimination that could accelerate treatment and improve its dismal prognosis.

Abbreviations: PDAC, Pancreatic ductal adenocarcinoma; sAXL, Soluble AXL; CP, Chronic pancreatitis; CA19-9, Carbohydrate antigen 19-9; RTKs, Receptor tyrosine kinases; PanINs, Pancreatic intraepithelial neoplasias; IPMNs, Intraductal papillary mucinous neoplasms; ROC, Receiver operating curve; AUC, Area under the curve; IQR, Interquartile range; IHC, Immunohistochemistry; FDA, Food and drug administration; GAS6, Growth arrest-specific factor 6; TCGA, The Cancer Genome Atlas; GTEX, Genotype-tissue expression; HCC, Hepatocellular carcinoma

*Corresponding authors.

E-mail addresses: pilar.navarro@iibb.csic.es (P. Navarro), pablo.garcia@iibb.csic.es (P. García de Frutos).

¶ N. M-B. and H. C. contributed equally to this work.

eBioMedicine 2022;75:
103797

Published online 29

December 2021

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103797>

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103797>

Funding This work was supported by grants PI20/00625 (PN), RTI2018-095672-B-I00 (AM and PGF), PI20/01696 (MG) and PI18/01034 (AC) from MICINN-FEDER and grant 2017/SGR/225 (PN) from Generalitat de Catalunya.

Copyright © 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Keywords: PDAC; AXL; Pancreas; Biomarker; Differential diagnosis

Research in context

Evidence before this study

Pancreatic cancer, and in particular pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), is one of the tumours with the worst prognosis. It is currently the third leading cause of cancer-related deaths in developed countries and is predicted to become the second cause by 2030. One of the reasons for this low survival rate is a late diagnosis, which is the consequence of the lack of bona fide biomarkers for early PDAC detection. Surgical resection is the only curative option for PDAC patients but applies to less than 20% of them, due to late diagnosis. Tissue overexpression of the AXL receptor tyrosine kinase in PDAC correlates with an unfavourable prognosis but at present has no use in the clinic. AXL can be proteolytically processed releasing a soluble form (sAXL) into the bloodstream. Here we explore the use of sAXL in plasma as a biomarker for PDAC early detection.

Added value of this study

Soluble AXL levels in plasma were significantly higher in the PDAC group than in chronic pancreatitis or healthy controls. Consequently, sAXL was found to be a potential biomarker to differentiate PDAC from chronic pancreatitis. An increase in sAXL occurred early in the development of the disease, and it was confirmed in established mouse models of the disease.

Implications of all the available evidence

Early and differential diagnosis of severe pancreatic cancers is an unmet clinical problem. To our knowledge, this is the first study of sAXL as a biomarker in this context. Importantly, sAXL was able to discriminate pancreatic cancer from chronic pancreatitis, adding value to the established biomarkers. The inclusion of sAXL in screening panels would provide additional diagnostic value and help clinicians to expedite surgical resection. The results indicate that AXL targeting could be a potential PDAC treatment for specific patients.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most frequent (>90%) type of pancreatic cancer and presents a major health concern due to its high mortality, ranking among the deadliest tumours.¹ This cancer is rarely

detected in its initial stages² and can quickly become a metastatic, therapy-resistant disease, with an average five-year survival of 3% after diagnosis.³ The dismal prognosis of these patients emphasizes the urgency to identify novel biomarkers for early diagnosis, which would allow surgical resection (currently the only option for curative therapy). In addition, these biomarkers would be important for clinical monitoring of high-risk patients, such as those harbouring germline genetic mutations linked to higher PDAC incidence or familial PDAC, as well as patients with chronic pancreatitis (CP).

Currently, PDAC diagnosis relies upon imaging procedures. Although recent studies have identified the genetic landscape of PDAC, and several genetic signatures for specific subtypes have been proposed,^{4–7} no gene expression or mutation panel is currently widely used for patient stratification. Secreted biomarkers have been widely studied for PDAC diagnosis in blood samples,⁸ but to date the carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) is the only FDA-approved biomarker.^{9,10} However, the inadequate sensitivity and specificity (mean values of 79% and 82%, respectively) of CA19-9 makes it unsuitable as a diagnostic tool for PDAC; thus, its clinical use is restricted to monitoring treatment response and recurrence in patients already diagnosed with PDAC.^{8–10} In particular, detection of the CA19-9 biomarker in blood results in false negatives for people with mutations in the *FUT3* gene (who make up 5–10% of the world population), as they do not express the Lewis antigen. Moreover, CA19-9 is expressed at high levels in non-malignant pancreatic inflammatory conditions, such as CP, leading to false positives.

A known risk factor associated with the PDAC aetiology is CP, a long-standing inflammation of the pancreas with episodes of acute inflammation. CP is a severe disorder with an annual prevalence close to 0.05%, and it leads to a significant reduction of quality of life. Genetically engineered mouse models of PDAC have demonstrated that pancreatic inflammation accelerates PDAC initiation and progression.¹¹ CP represents a continuum that ranges from recurrent acute pancreatitis, presenting either no or subtle architectural changes of the gland that are difficult to identify by imaging diagnostic tools,¹² to advanced CP, which shows architectural gland distortions such as calcifications, side branches,

parenchymal atrophy, and main ductal abnormalities.¹³ At these advanced stages, lesions detected in follow-ups (e.g., by computed tomography scan, magnetic resonance imaging or endoscopic ultrasound) can be indistinguishable from PDAC. Thus, differential diagnosis between both diseases is challenging, even after performing fine needle aspiration, as targeting the sampling site may be difficult since inflammation and cancer display similar characteristics in imaging studies. In addition, symptoms for both PDAC and CP can be similar and vague, such as upper abdominal pain, nausea and vomiting, digestive symptoms, weight loss, and diabetes. Given that early diagnosis is critical for clinical decisions about PDAC, biomarkers that differentiate pancreatic inflammation from PDAC are being actively sought.¹⁴

The TAM receptor family of receptor tyrosine kinases (RTKs) comprises three genes in humans: *TYRO3* (GeneID:7301), *AXL* (GeneID:558), and *MerTK* (GeneID:10461). The TAM receptors share a common modular architecture, composed of two immunoglobulin-like and two fibronectin III-like modules extracellularly, a transmembrane region, and a conserved tyrosine kinase domain. Further, they share two vitamin K-dependent protein ligands, growth arrest-specific factor 6 (GAS6) and protein S (PROS1), which are present in plasma and have the capacity to bind phosphatidylserine exposed in the cellular membrane of activated or apoptotic cells. While TAM receptors are not essential for embryological development, they play important roles in tissue homeostasis especially in tissue repair, controlling cell proliferation and survival, and immune regulation.¹⁵ Not surprisingly, these receptors are known to be involved in cancer progression and metastasis.¹⁶ In several cancer types, including PDAC, high levels of expression of the AXL protein in tissue samples correlates with adverse prognosis.^{17,18} Further functional *in vitro* and *in vivo* studies have identified AXL as a putative target for pharmacological or immunological therapy in PDAC.^{19,20}

The TAM receptors undergo an enzymatic processing in the cell membrane through an ADAM10/ADAM17-specific shedding mechanism that cleaves the extracellular part of the receptors, releasing a soluble form. In particular, soluble AXL (sAXL) is present in human blood, where it forms a complex with its ligand GAS6,²¹ and has been detected at high levels in different pathologies, such as heart failure, certain inflammatory conditions, and several tumours.^{21–27} In this study, we explored whether sAXL detection in plasma could be used as a novel tool for PDAC diagnosis. We analysed the expression of total AXL and sAXL in tissue and blood samples from human normal and pathological pancreas from different cohorts of patients, as well as in pancreatic cancer cell lines. Using a third independent patient cohort of familial hereditary pancreatic cancer and two well-characterized mouse models of pancreatic

cancer, we validated the potential of sAXL for early detection of PDAC. Our results support the use of circulating sAXL determination as an accurate non-invasive diagnostic tool for PDAC, in particular for PDAC–CP discrimination. These results have promising implications for oncologists and PDAC patient management.

Methods

Ethics

This study was approved by the Ethics Committees of Parc de Salut Mar (CEIm-Parc de Salut Mar), Hospital Clinic of Barcelona and Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, and was implemented in accordance with the Helsinki Declaration of Principles. The Ethics Committees of PRBB (Barcelona) and CNIO (Madrid) approved animal experiments. Project numbers are indicated below.

Patient samples

For histological studies, samples from normal pancreas ($n = 11$), CP ($n = 14$), preneoplastic lesions including Pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs, $n = 13$), Intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs, $n = 12$), and PDAC ($n = 17$), were obtained from Parc de Salut MAR Biobank (MARBiobanc), Barcelona (Table S1 and S2).

Plasma samples from two independent cohorts were used. A first cohort was from Barcelona-Hospital del Mar (HMar cohort), and comprised samples from 7 healthy controls, 21 patients with CP, and 31 patients with PDAC.²⁸ The second cohort was from Hospital Clínic of Barcelona (HClínic cohort), and comprised samples from 46 healthy controls, 16 patients with CP, and 80 patients with PDAC.²⁹ Tables S1, S3, S4 and S5 summarize the patient characteristics and clinical data corresponding to the plasma samples included in these two independent cohorts. The study was evaluated and approved by the Drug Research Ethics Committee of Parc de Salut Mar (CEIm-Parc de Salut Mar) (2017/7449/1 and 2020/9067/1) and Institutional Ethics Committee of Hospital Clinic of Barcelona (HCB/2019/0247). The study incorporates a third cohort of individuals classified as having hereditary or familial PDAC according to the inclusion criteria of the Spanish Familial Pancreatic cancer registry (PANGENFAM) (Ramon y Cajal Health Research Institute, IRYCIS, Madrid), as well as healthy, high-risk family members in a secondary screening program (Ethics Committee number 029-16) (Table S6). This cohort also included cases with no reported hereditary or familial pancreatic cancer syndrome that were classified as sporadic cases.³⁰ All individual participants in the three studies voluntarily signed an informed consent allowing the use of their plasma samples for research purposes.

Animal models

Ela-KRAS^{G12V}p53^{lox/lox} mice carrying specific pancreatic oncogenic mutations in KRAS, and Ela-1-myc transgenic mice, with c-MYC overexpression, were bred and grown as previously reported.^{31–33} Animals were sacrificed at 3 to 6 months of age, at which point most mice had developed a pancreatic tumour, as assessed histologically. All animal procedures and protocols were performed with approval from our institutional Animal Care Committee (PRBB, Barcelona, PNM 16-009/9067, and CNIO, Madrid PROEX 257/19).

Immunohistochemistry (IHC)

Biological samples were obtained from Parc de Salut MAR Biobank (MARBiobanc), Barcelona. Paraffin sections (3 μ m) were used for IHC analysis, as described.³⁴ Goat anti-AXL polyclonal antibody (R and D Systems Cat# AF154, RRID:AB_354852) or irrelevant IgG (as negative control, Sigma-Aldrich Cat# I5256, RRID:AB_1163599) were used as primary antibodies, and Immpress HRP anti-goat (Vector Laboratories, Cat# MP-7405, RRID:AB_2336526) as secondary antibody. Immunostained samples were analysed by two experts in pancreatic pathology (MI and NM-B), who recorded the intensity and percentage of stained cells to calculate the H-scores.³⁵

Database RNA expression analysis of AXL in PDAC

AXL mRNA expression were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database (<https://www.cancer.gov/tcga>). Values were normalized using the TMM (Trimmed Mean of M Values) method and expressed as log₂ CPM (counts per million).³⁶ RNA expression data of 171 control pancreatic tissue were consulted in GTEx (Genotype-Tissue Expression) database (<https://www.gtexportal.org/>). For normal versus tumour comparison, data were analysed using the GEPIA2 web server (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#about>).³⁷ Samples from TCGA and GTEx were processed using a uniform bioinformatics pipeline to eliminate batch effect due to distinct computation processing. Survival TCGA Kaplan-Meier analyses and cut-off values were derived from Human Protein Atlas (<https://www.v2o.proteinatlas.org>). Comparison of AXL RNA expression data from normal pancreas versus PanINs was derived from Ayars et al.³⁸ and RNA data from control versus CP and PDAC was obtained from Abdollahi et al (E-EMBL-6).³⁹

Human pancreatic cancer cell lines

Five human pancreatic cancer cell lines were studied: SK-PC-1, adenocarcinoma cells of the exocrine pancreas with epithelial-like morphology (RRID:CVCL_4054); PANC-1, a pancreatic epithelioid carcinoma cell (RRID:CVCL_0480); Hs 766T adenocarcinoma metastatic

cells found in lymph nodes (RRID:CVCL_0334); RWP-1, a pancreatic adenocarcinoma cell line derived from a liver metastasis (RRID:CVCL_4373); and Capan-1, a pancreatic ductal adenocarcinoma derived from metastatic sites in the liver (RRID:CVCL_0237). Cells were obtained from the Cell Culture Maintenance Unit (IMIM Core Facilities, Hospital del Mar Medical Research Institute, Barcelona), and validated by short tandem repeat (STR) profile or direct purchase from official repositories (ATCC or ECACC). Cells were cultured in DMEM 10% foetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂.

Immunoblotting

AXL expression levels in cellular extracts and cultured cells conditioned media were analysed by standard immunoblotting. Briefly, 10% SDS-PAGE was electroblotted onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). After transfer, membranes were blocked, washed, and incubated overnight at 4 °C with anti-AXL antibodies (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-1096, RRID:AB_630894; and R and D Systems Cat# AF154, RRID:AB_354852) and goat anti-pyruvate kinase (Chemicon Cat# AB1235). Secondary antibodies conjugated to HRP (Thermo Fisher Scientific Cat# 31402, RRID:AB_228395) were used to develop the specific signal by chemoluminescence using Pierce substrate (Thermo Fisher Scientific) in a ChemiDoc Imaging System (Bio-rad).

RNA quantification

Total RNA was purified using GenElute mammalian total RNA kit (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions for attached cells. The RNA concentration and purity were analysed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo-fisher) was used to retrotranscribe the RNA. Real-time qPCR was performed with SybrTM Green PCR Master Mix (Life Technologies), 25 ng of cDNA, and forward and reverse primers for either AXL (Invitrogen) or (as a control) the housekeeping gene *GAPDH*. Alternatively, AXL expression was determined using a Taqman specific probe (Hs01064444) using TATA-binding protein (TBP) as housekeeping control. To analyse the samples, the fold-change in relative gene expression was calculated using the $\Delta\Delta$ CT method.

Measurement of plasma levels of sAXL, GAS6, and CA19-9 by ELISA

The levels of human sAXL and GAS6 in plasma or culture media were quantified with the human ELISA kits (R and D Systems) according to manufacturers'

protocols. Plasma samples were diluted 1:50 for the analysis, while culture media were diluted 1:10. The proteins were detected by absorbance determination at 450–570 nm. Plasma levels of CA19-9 were measured by an electrochemiluminescent technique in a Cobas 4000 analyser (Roche Diagnostics) at the Laboratori de Referència de Catalunya (Barcelona, Spain) and at the CORE laboratory (Hospital Clínic, Barcelona). Murine plasma sAXL and GAS6 levels were quantified with the respective mouse ELISA kits (R and D Systems) according to manufacturers' protocols. Plasma samples were diluted 1:50 for the analysis. The proteins were detected by absorbance determination at 450–570 nm. Biomarker determinations were performed blinded to which group each sample belonged.

Statistical analysis

Data analyses were carried out using the SPSS software (IBM SPSS statistics version 23). Statistical significance was set at $p < 0.05$ ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). As ELISA measurements of sAXL, GAS6, and CA19-9 showed skewed distributions, data were described as median and interquartile range (IQR), specifying quartiles 25 and 75 in the supplementary tables (Q25, Q75), and the nonparametric analyses of Mann-Whitney or Kruskal-Wallis were applied. Multivariate analysis (age, gender, diabetes and obstructive jaundice) was performed in HClinic cohort through median regression models to rule out the effect of these factors in sAXL, GAS6 and CA19-9 determinations. Logistic regression models and receiver operating characteristic (ROC) curve analyses were used to study the potential of sAXL, GAS6, or CA19-9, to discriminate PDAC from CP or healthy controls. Results were given as area under curve (AUC) and standard error with 95% confidence limits (Table S7). The cut-off values maximizing Youden index were derived from this analysis, except indicated otherwise in which we primed a better balance between sensitivity and specificity (Table S8). For the combination of two markers, multivariable logistic regression models were performed, considering sAXL and GAS6 as continuous variables and CA19-9 dichotomized. For Kaplan Meier survival analysis, all patients were followed up until death or last hospital admission, and the cut-off point was given by maximally selected rank statistic using the web based tool Cutoff Finder.⁴⁰ Patients with missing data were excluded in the analyses of such variables.

Role of funders

Funding sources had no role in writing, data collection, analysis, or interpretation, or any aspect pertinent to the study. The corresponding authors had full access to all data and had final responsibility for the decision to submit the manuscript for publication.

Results

Expression of AXL in tissue samples from normal and pathological human pancreas

Overexpression of the AXL protein in pancreatic cancer tumours has been previously described.^{17,18,41} However, AXL expression has not been investigated in pathological conditions associated with high risk for developing PDAC, such as CP or preneoplastic lesions. Here, we analysed AXL expression by immunohistochemistry (IHC) in normal and pathological tissue pancreatic samples, including CP, pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs), intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs), and PDAC (Fig. 1, Table S2). In general, no AXL expression was observed in the normal pancreas and no expression or only a diffuse expression was observed in CP lesions. Overall, the strongest AXL expression was observed in IPMN and PDAC samples (Fig. 1a and 1b). However, AXL expression was heterogeneous, with no expression in some tumours (see IHC quantification using the H-score; Fig. 1b). Thus, AXL is frequently overexpressed in pancreatic cancer and is already induced in precursor lesions (PanIN and IPMN) but not during inflammatory conditions like CP. These data were confirmed using RNA expression data from 179 cases of PDAC (TCGA database) and 171 pancreatic control tissues (GTEx database; Fig. 1c), as well as RNA expression from other previous works including PanIN lesions, CP and PDAC (Figure S1).^{38,39}

Recent progresses in cancer genomics have identified two main PDAC subtypes according to their genetic signatures: i) the classical/progenitor subtype, which are normally well-differentiated tumours, and ii) the squamous/basal-like subtype, which have a worse prognosis and low differentiation.^{4,5,7,9} Thus, we interrogated the TCGA database to gain further insights about AXL expression in pancreatic cancer. Notably, AXL expression was higher in the squamous/basal-like versus classical tumour subtype, using three different genomic classifications (Fig. 1d).^{4-7,9} These results indicate that AXL overexpression is observed in most PDAC samples, and that the poorly differentiated, squamous/basal-like pancreatic tumours express the highest levels of AXL.

Expression of AXL in cell lines derived from pancreatic cancer

To perform a more exhaustive analysis of AXL expression in PDAC, we explored established human pancreatic cancer cell lines (Fig. 2). Detection of AXL in total cell extracts by immunoblot showed a double band of around 130 KDa, as expected.¹⁸ In the cellular extracts of the five cell lines tested, SK-PC-1 showed the highest AXL expression, PANC-1 and Hs 766T cells showed intermediate levels, and RWP-1 and Capan-1 showed the lowest AXL expression (Fig. 2a). This pattern of expression was mirrored at the mRNA level (Fig. 2b). Next, we

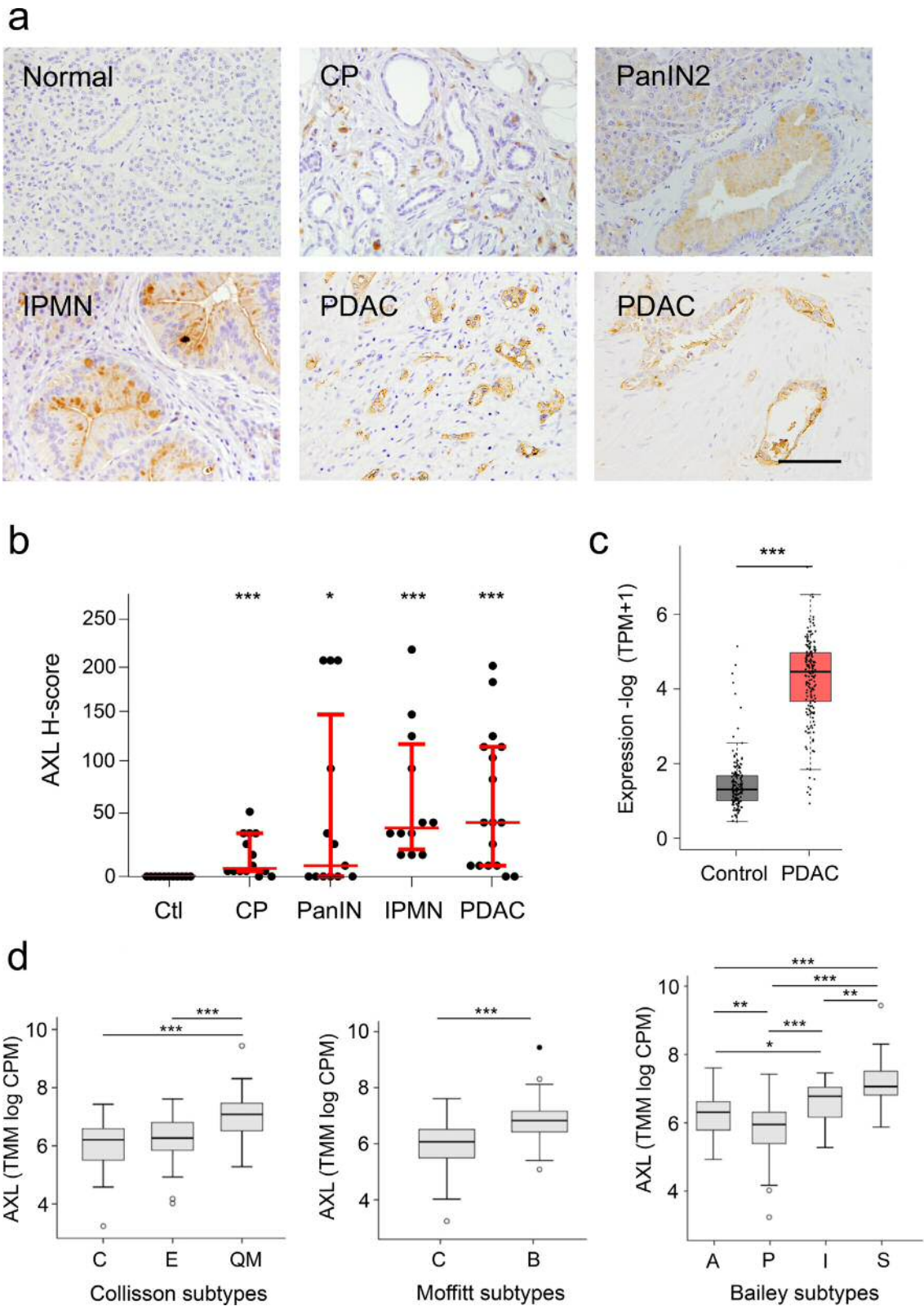


Fig. 1. Detection of AXL in normal and pathological human pancreatic samples. (a) Immunohistochemical analysis of AXL protein from the following human pancreatic samples: normal tissue ($n = 11$), chronic pancreatitis ($n = 14$), PanIN lesions ($n = 13$); IPMN

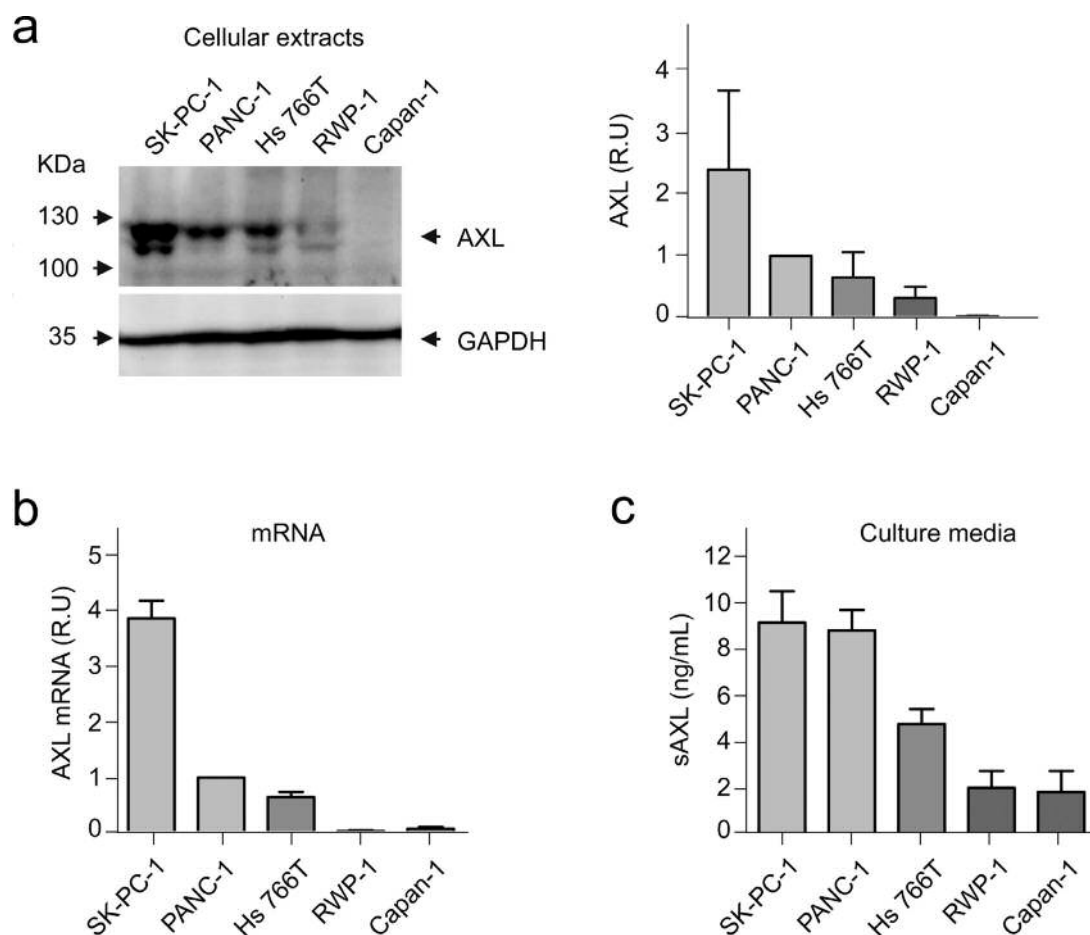


Fig. 2. Expression of AXL in pancreatic cancer cell lines. (a) Immunoblot of cellular extracts of SK-PC-1, PANC-1, Hs 766T, RWP-1, and Capan-1 cells (left) using antibodies anti-AXL or anti-GAPDH (as loading control). Bands were quantified by densitometry with respect to GAPDH (right). (b) Total RNA was analysed by RT-qPCR for the relative expression of *AXL*. Bars represent mean \pm SE. (c) Detection of sAXL by ELISA in conditioned media of each cell line after a serum starvation period of 48 h. Bars represent mean \pm and SE. R.U., relative units.

determined the concentration of processed sAXL in culture media by ELISA. The pattern of expression was consistent with the previous results of total AXL, with sAXL levels highest in the SK-PC-1, PANC-1, and Hs 766T cell lines, and lower in the RWP-1 and Capan-1 cell lines (Fig. 2c). Secreted sAXL levels could be affected by the level of ADAM10/17, the proteases releasing sAXL to the media. These results confirmed the heterogeneity of AXL expression in PDAC and demonstrated that pancreatic tumour cell lines can release the proteolytically processed sAXL fragment to the extracellular milieu.

Detection of sAXL and GAS6 in plasma from patients with CP or PDAC

To determine if circulating sAXL can be a diagnostic tool for PDAC patients, we next used ELISA to analyse the levels of both sAXL and GAS6 (the specific ligand of AXL, which binds to and sequesters circulating sAXL in blood) in plasma of healthy controls or patients with CP or PDAC. We used two independent cohorts of plasma samples: HMar cohort ($n = 59$) and HClinic cohort ($n = 142$; Tables S1, S3-S5 for clinico-pathological data of patients). To avoid deviations due to cohort definition, sample handling, or processing, we analysed each

lesions ($n = 12$); and PDAC ($n = 17$). Scale bars, 100 μ m. (b) Graph shows the AXL staining quantification by H-score. Note that asterisks refer to the comparison of groups with the control, except for the comparisons labelled otherwise. (c) GEPIA2 analysis of AXL RNA levels comparison between normal pancreatic tissue (control, GTEx database, $n = 171$) and PDAC (TCGA database, $n = 179$). (d) AXL RNA levels in each subgroup of the different PDAC molecular classifications. From left to right, Collision: C (classical), E (exocrine), QM (quasi-mesenchymal); Moffitt: C (classical), B (basal-like); and Bailey: A (ADEX), P (progenitor), I (immunogenic) and S (squamous). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test).

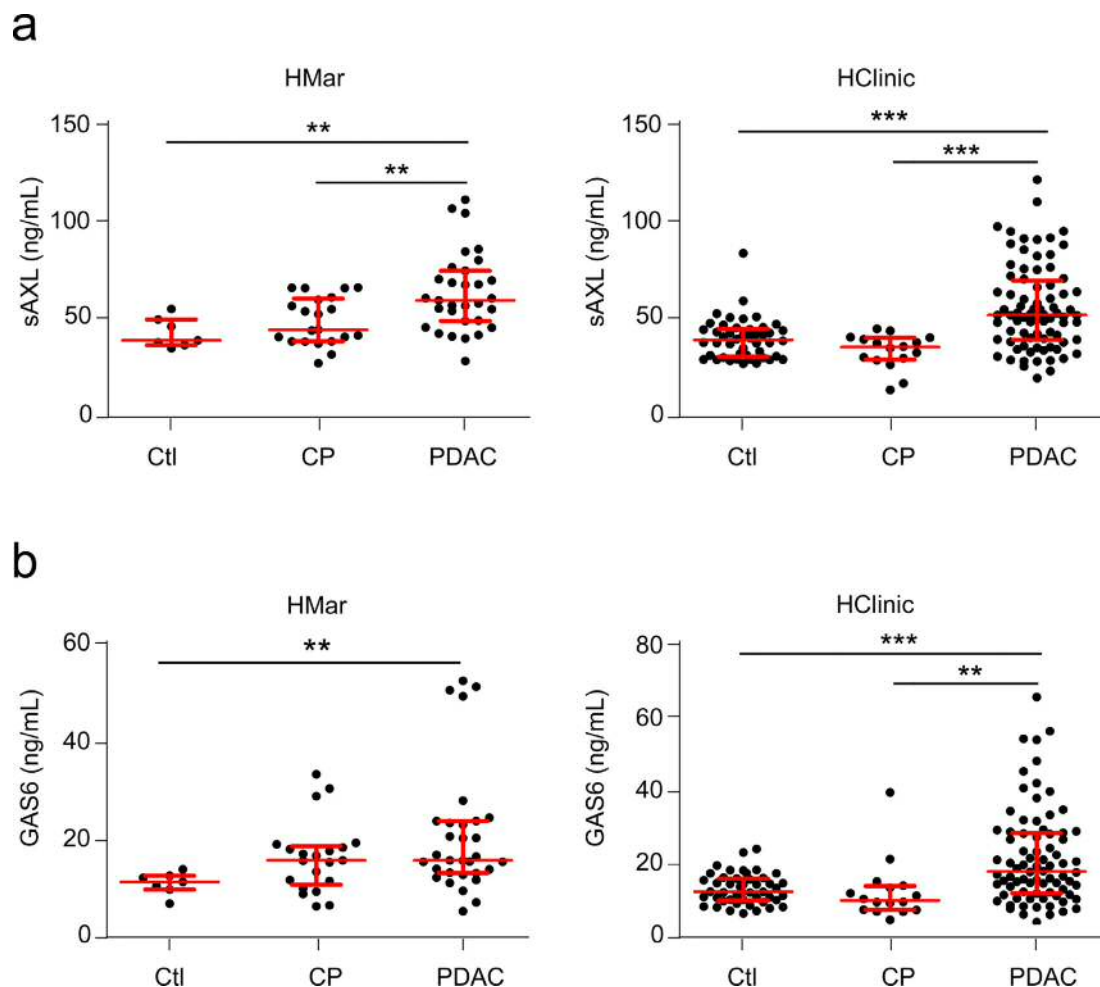


Fig. 3. sAXL and GAS6 plasma levels in human samples from healthy controls or patients with CP or PDAC in two different cohorts. (a) Concentration of the sAXL in the HMar cohort (left panel) or HClinic cohort (right panel), including plasma samples from healthy controls (HMar, $n = 7$; HClinic, $n = 46$) or patients with CP (HMar, $n = 21$; HClinic, $n = 16$), or PDAC (HMar, $n = 31$; HClinic, $n = 80$). (b) GAS6 concentrations in HMar cohort (left panel) or HClinic cohort (right panel) including plasma samples from healthy controls or patients with CP and PDAC, as before. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test).

cohort separately (Fig. 3). In HMar cohort (Fig. 3a, left), the plasma levels of sAXL significantly increased in PDAC patients (median, 59.78 ng/mL; IQR, 25.38) as compared to healthy controls (median, 39.45 ng/mL; IQR, 13.02; $p = 0.002$) or patients with CP (median, 44.82 ng/mL; IQR, 21.75; $p = 0.003$). These results were verified in a second larger cohort (HClinic; Fig. 3a, right), where plasma sAXL levels were also significantly increased in PDAC patients (median, 52.66 ng/mL; IQR, 30.08) as compared to healthy controls (median, 40.03 ng/mL; IQR, 14.13; $p < 0.0001$) or patients with CP (median, 36.34 ng/mL; IQR, 11.05; $p < 0.0001$). Importantly, statistical significance was maintained in multivariate analysis, discarding age, sex, diabetes and obstructive jaundice as possible confounding factors (Figure S2, Table S5).

Determination of GAS6 concentration by ELISA in the same samples (Fig. 3b) showed similar patterns to sAXL, with a significant increase in PDAC patients (median, 15.88 ng/mL; IQR, 10.62, for the HMar cohort and median, 18.14 ng/mL; IQR, 16.34, for the HClinic cohort) as compared to healthy control samples (median, 11.47 ng/mL; IQR 2.79; $p = 0.002$, for HMar cohort and median, 12.66 ng/mL; IQR, 5.96; $p < 0.0001$, for HClinic cohort). No difference was found between the CP and PDAC in the HMar cohort, while significant differences were found in the CP group from the HClinic cohort (median, 15.88 ng/mL; IQR, 7.90; $p = 0.328$ for HMar cohort and median, 10.31 ng/mL; IQR, 6.44; $p = 0.001$, for the HClinic cohort). Differences were also significant in the multivariate analysis (Figure S2, Table S5). These results suggest that the

GAS6 ligand is bound to circulating sAXL in blood, almost mirroring its plasma levels.

Analysis of sAXL and GAS6 expression during PDAC progression and prognostic value

To determine whether sAXL levels reflects PDAC progression, we next classified plasma samples from PDAC patients according to disease clinical staging and compared to controls, for both independent cohorts (Fig. 4a). Samples grouped according to the TNM staging revealed that stage II, III and IV showed higher sAXL concentrations compared to controls but with no significant differences among them observed in a Kruskal-Wallis test (Fig. 4a). These data were confirmed by TCGA RNA database (Fig. 4b). As expected, the concentration of GAS6 in our cohorts and TCGA database

showed no differences in the groups classified according to TNM staging (Kruskal-Wallis test) (Figure S3a, b). These data suggest that sAXL could be a good biomarker for early diagnosis of PDAC, as its overexpression is detected at the initial stages of the disease independently of its clinical stage.

The prognostic value of AXL RNA expression was explored by interrogating data from TCGA dataset, which confirmed that increased RNA expression of AXL in tumour samples correlated with significant shorter survival (Fig. 4c, $p = 0.0096$). A similar analysis for GAS6 showed a trend towards shorter survival in patients with high GAS6 expression (Figure S3c, $p = 0.12$). We also studied the prognostic value of sAXL and GAS6 in our cohorts by analysing whether their plasma levels correlate with patient survival data. Interestingly, a trend towards decreased survival in patients

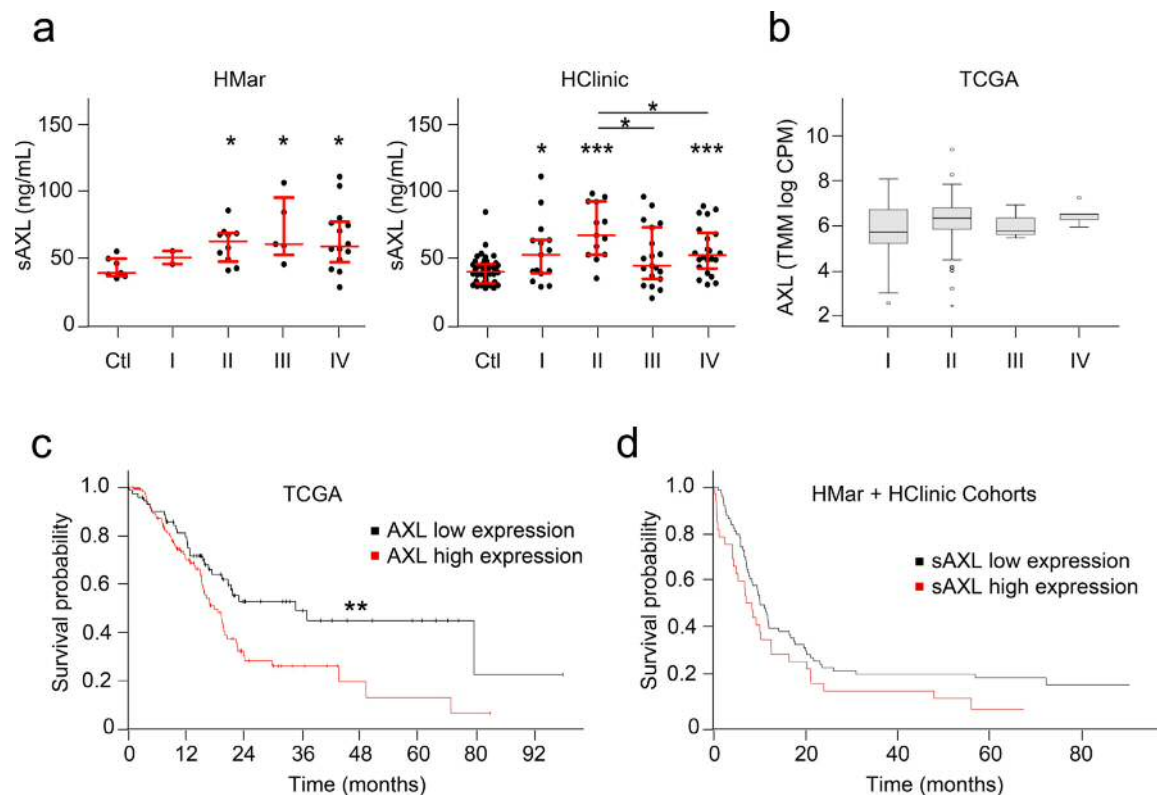


Fig. 4. Analysis of sAXL plasma levels during PDAC progression and prognostic value. (a) Left panel, determination of sAXL plasma levels in HMar cohort samples from controls ($n = 7$) or PDAC patients segregated by clinical stage: I ($n = 2$), II ($n = 9$), III ($n = 4$), IV ($n = 14$). Right panel, sAXL in HClinic cohort according to stage: Ctl ($n = 46$); I ($n = 15$); II ($n = 13$); III ($n = 19$); IV ($n = 22$). Data were analysed by Mann-Whitney test, all asterisks refer to control unless otherwise specified * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Data were also analysed with Kruskal-Wallis test (HMar, $p = 0.628$; HClinic, $p = 0.056$). (b) TCGA AXL RNA expression in different tumour stages: I ($n = 21$), II ($n = 150$), III ($n = 3$), IV ($n = 5$). Kruskal-Wallis $p = 0.148$. (c) Prognosis of patients according to their AXL RNA levels was analysed in TCGA data. A cut off at 14.09 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) was set to discriminate low ($n = 73$) or high expression groups ($n = 103$), $p = 0.0096$ (log rank test). (d) Prognosis of patients in both cohorts according to their sAXL plasma levels was analysed using a cut off at 67.28 ng/mL ($p = 0.068$), which best discriminated patients with low ($n = 74$) and high ($n = 33$) sAXL plasma levels in terms of survival.

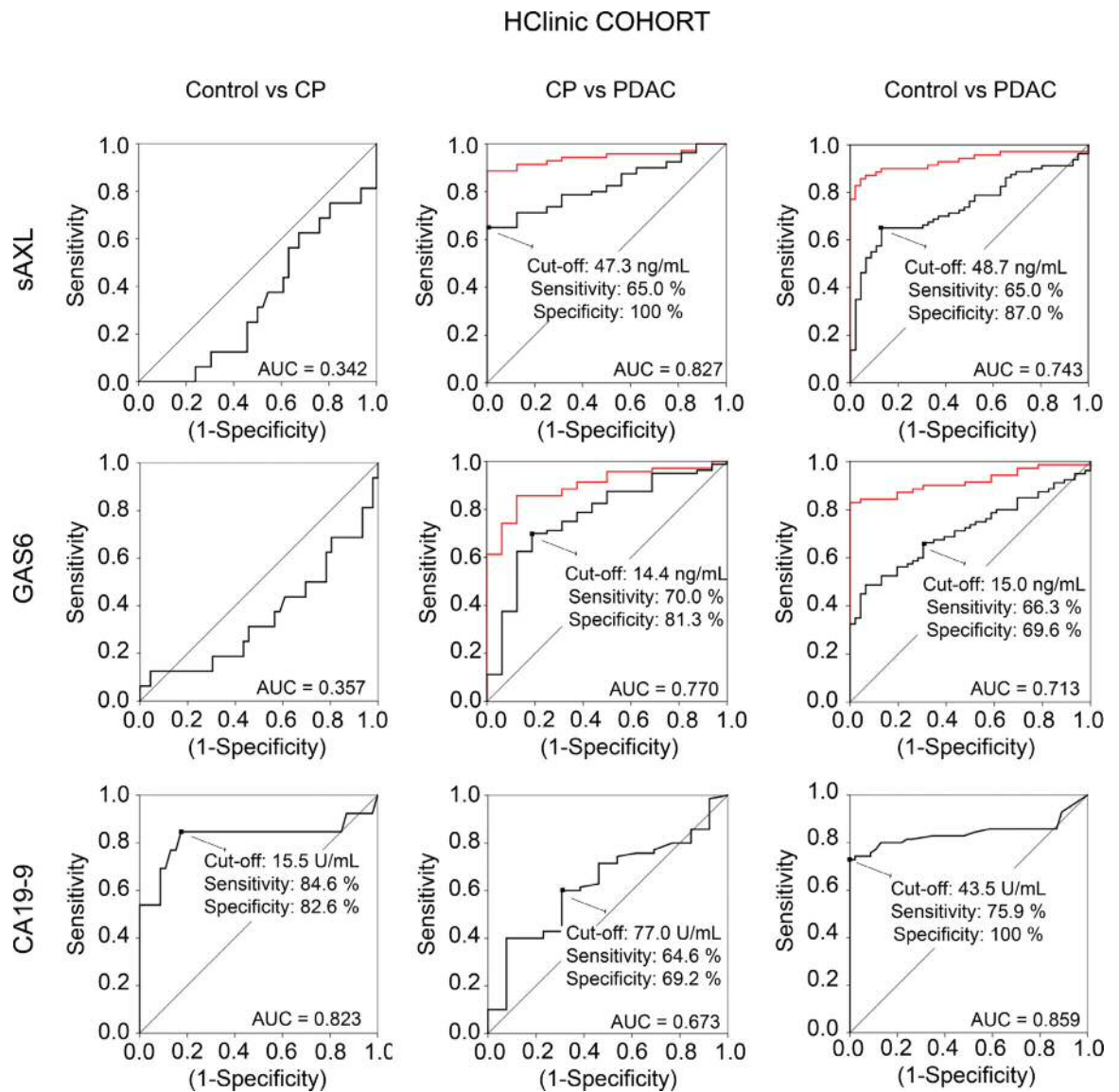


Fig. 5. Sensitivity and specificity of sAXL, GAS6, and CA19-9 plasma levels for discriminating PDAC, CP and healthy controls. ROC analysis in the HClinic cohort to compare the performance of sAXL, GAS6 and CA19-9 to discriminate between PDAC, CP and controls. Area under the curve (AUC), cut-off values maximizing Youden index (except for CA19-9 in CP vs PDAC, see Methods) and sensitivity/specificity values are depicted in the graph. Red lines show ROC curves for sAXL or GAS6 combined with CA19-9.

expressing high levels of sAXL and GAS6 was observed ($p = 0.068$; $p = 0.14$, respectively; Fig. 4d and Figure S3d).

Altogether, these results suggest that sAXL could be a non-invasive biomarker for PDAC diagnosis, and that AXL RNA expression could also predict patient prognosis. Moreover, although GAS6 levels show quite similar results, sAXL performed better as a biomarker for PDAC, as high levels of GAS6 can also be occasionally found in CP.

Validation of sAXL as candidate biomarker for PDAC diagnosis by ROC curve analysis

We next performed a univariable or multivariable logistic regression models to evaluate the diagnostic value of the sAXL and GAS6 candidate markers alone or combined with the well-recognized biomarker CA19-9 antigen (Figs. 5, S4, and S5, and Tables S7 and S8). In both cohorts, the mean values of CA19-9 were significantly higher in the PDAC group (as expected from published data) but also in the pancreatitis group, as compared to

controls (Figure S4). When we performed receiver operating characteristic (ROC) curves in HClinic cohort for sAXL, GAS6, and CA19-9, all three significantly distinguished PDAC groups from control groups, with AUC values of 0.743, 0.713 and 0.859 respectively (Fig. 5 and Table S7). Importantly, sAXL performed best for discriminating those patients with PDAC from those with CP, with an AUC of 0.827 as compared to 0.770 for GAS6, and of 0.673 for CA19-9. Similar results were obtained in the HMar cohort, although with less statistical power due to the smaller size of the groups (Figure S5; Table S7). Therefore, our data suggest that sAXL is a better parameter than CA19-9 to differentiate CP from PDAC.

To assess whether a combination of these markers could increase diagnostic accuracy for clinical use, we calculated the values of sAXL, GAS6, and CA19-9 that maximized the Youden index for the comparison of PDAC samples to CP or control groups (Figs. 5 and S5, and Table S8). Using these cut-off points as diagnostic tools (Table S8), we found that a combination of the established thresholds for sAXL and GAS6 in the HClinic cohort improved their sensitivity and their individual discriminatory powers, by reducing the number of false negatives when comparing either controls or CP versus PDAC patients (Table S8). In addition, combined high sAXL or GAS6 levels and high CA19-9 levels showed a very good sensitivity (91.3%) and specificity (100%) for distinguishing PDAC patients from the control group. Interestingly, when these criteria were applied to the CP–PDAC differential diagnosis, the combination of either with CA19-9 also significantly improved the sensitivity (89.9% for sAXL/CA19-9 and 87.3% for GAS6/CA19-9) and specificity (100% and 92.3%, respectively) as compared to either biomarker alone. Thus, while sAXL outperformed CA19-9 in differential diagnosis of PDAC versus CP, the combined panel of CA19-9 and sAXL (or GAS6) improved the diagnostic potential for PDAC, especially for the differential diagnosis with CP.

Detection of sAXL in plasma samples from healthy, high-risk individuals from hereditary/familial PDAC patients

Our results of sAXL plasma levels during PDAC progression after sample stratification suggested that sAXL is elevated already in the initial stages of the disease. Therefore, sAXL emerged as an interesting candidate for screening at-risk PDAC patients, such as individuals with germline pathogenic genetic mutations. We therefore measured the concentration of sAXL in a population ($n = 22$) of individuals classified as high-risk members of hereditary or familial pancreatic cancer (H/FPC) families according to established inclusion criteria (see Methods) (Fig. 6). These high-risk individuals were participating in a secondary screening program for early

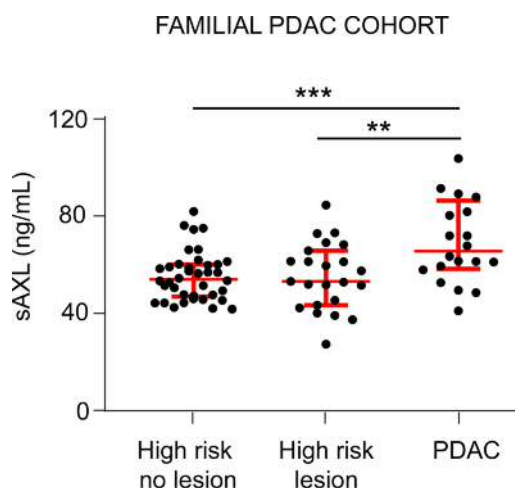


Fig. 6. sAXL concentration in plasma samples from a hereditary/familial PDAC cohort. sAXL levels were determined in plasma samples from individuals at high-risk of hereditary/familial pancreatic cancer with no lesions (high risk no lesion, $n = 26$) or with initial preneoplastic lesions (cysts or IPMNs, high risk lesion, $n = 22$) and compared to patients with PDAC ($n = 20$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test).

PDAC detection, with or without a known genetic cause, and had been diagnosed with pancreatic cysts or IPMN, but with no cases of PDAC at the time of sample extraction (high-risk (HR) lesion cohort). We compared the values with those from a group of patients with PDAC ($n = 20$; PDAC) and with a second group of high-risk individuals who were participating in the secondary screening program and were negative for pancreatic lesions on imaging ($n = 26$; HR no lesion cohort). PDAC patients, either H/FPC or sporadic, had a significantly increased sAXL concentration (median, 65.89 ng/mL; IQR, 25.96) as compared to high-risk healthy controls (HR no lesion, median, 56.95 ng/mL; IQR, 23.33; $p = 0.0031$) (Fig. 6). In the cohort of high-risk with an initial pancreatic lesion, sAXL plasma levels showed also significantly lower levels (HR lesion, median, 53.42 ng/mL; IQR, 23.39) than those detected in PDAC ($p = 0.0114$), with similar values to those from the high-risk control group with no lesions ($p = 0.748$) (Fig. 6). Thus, our results showed that sAXL is not increased in people from the high-risk cohort who had not developed PDAC, in accordance to the clinical data from their close follow-up and screening tests.

Detection of plasma levels of sAXL in mouse models of pancreatic cancer

To better understand the correlation of plasma sAXL levels with pancreatic cancer development, we determined the value of these parameters in plasma of mice from two well-described models of pancreatic

cancer.^{11,32} First, we used a KRAS-driven transgenic mouse model, Ela-Kras^{G12V} p53^{lox/lox} (here, KRAS mice), which expresses the G12V mutated KRAS oncogene under the pancreatic specific elastase promoter and has a homozygous deletion of the p53 gene. These mice initially develop precursor preneoplastic lesions—PanINs—which progress to PDAC at around 3–4 months of age. This model is recognized as one of the best to mirror human disease, as it recapitulates the different stages of PDAC progression as well as its histological hallmarks.¹¹ Plasma samples were collected from the KRAS mice ($n = 23$), animals were euthanized, and pancreas were analysed histologically to detect the presence of precursor lesions and/or adenocarcinomas. Next, we determined the plasma concentration of sAXL and GAS6 by ELISA (Fig. 7). KRAS mice that developed PDAC ($n = 15$) had an increased concentration of sAXL (median 47.79 ng/mL; IQR 4.52) in their plasma as compared to WT animals ($n = 10$) of the same age (median, 33.53 ng/mL; IQR 4.65; $p = 0.0003$). We also analysed plasma samples from KRAS mice whose pancreas histology showed preneoplastic lesions but not PDAC ($n = 8$); these mice had sAXL concentrations in

plasma similar to control animals (median 33.89 ng/mL; IQR, 4.36; $p = 0.590$). Next, to validate whether sAXL is a specific biomarker for PDAC, we used the Ela-1-myc transgenic mouse model (here, MYC mice).³² These animals overexpress the *c-MYC* oncogene under the elastase promoter and develop pancreatic tumours at 3–6 months of age. Plasma samples from MYC mice ($n = 11$) were analysed by ELISA to determine sAXL levels. Strikingly, and in contrast to the results from KRAS mice, the plasma levels of sAXL were not increased in MYC mice compared to control wild type mice from the same strain (median 30.41 ng/mL; IQR 14.36; $p = 0.207$). Histological characterization of tumours from the MYC mice showed mostly acinar carcinomas and occasionally mixed ductal/acinar tumours, as expected.³² The value of GAS6 in KRAS-driven preneoplastic or PDACs and *c-MYC*-driven pancreatic tumours followed a similar pattern to sAXL, although in this case the differences observed were less significant (Fig. 7b). KRAS mutant tumour-positive animals had increased concentration of GAS6 (median, 37.92 ng/mL; IQR, 25.0) in their plasma as compared to control animals (median, 23.90 ng/mL; IQR, 9.72; $p = 0.004$). Both

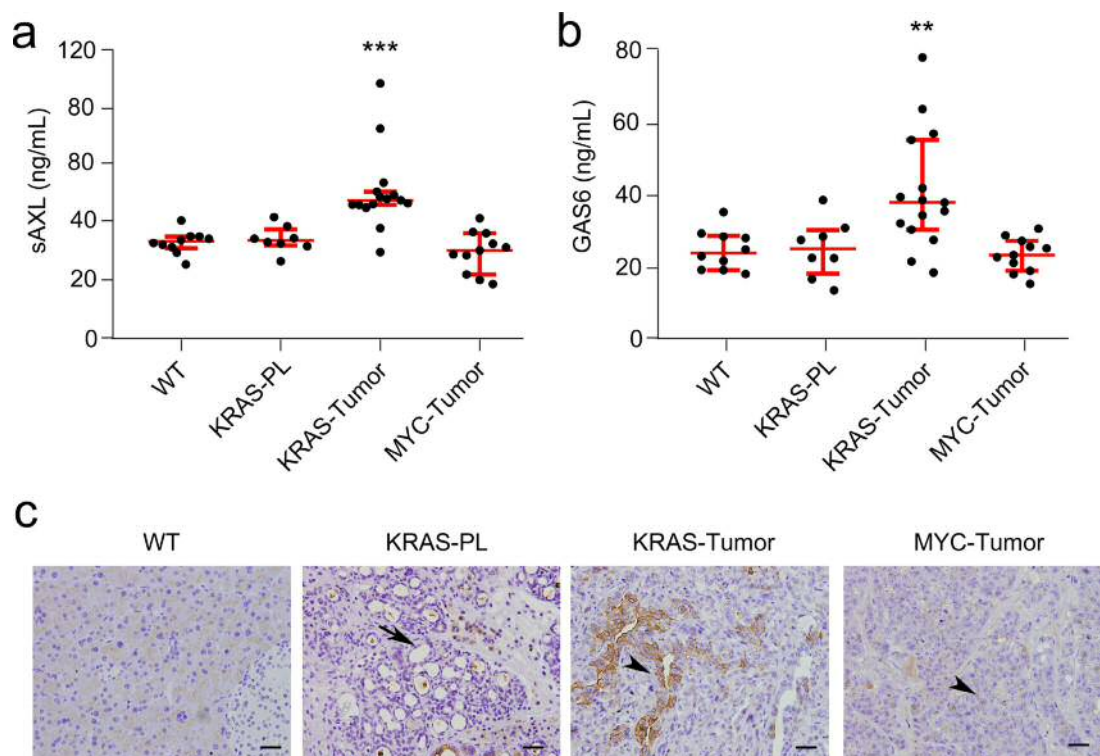


Fig. 7. Analysis of sAXL and GAS6 in murine PDAC models. (a) sAXL was measured in plasma samples from KRAS or MYC- driven transgenic PDAC mouse models. (b) GAS6 values in plasma samples from KRAS and MYC- driven transgenic PDAC mouse models. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test). (c) AXL immunohistochemistry in mouse samples from normal pancreas of control mice (WT), KRAS-driven pancreatic precursor lesions (KRAS-PL), KRAS-driven PDAC tumours (KRAS-Tumour) and MYC-driven tumours. Arrows indicate precursor lesions whereas arrowheads highlight tumour cells. Bar, 100 μ m.

KRAS mice (with or without preneoplastic lesions) and MYC mice had values similar to WT mice (KRAS: median, 25.01 ng/mL; IQR, 10.11; $p = 0.965$; MYC: median, 23.32 ng/mL; IQR, 8.35; $p = 0.647$). Moreover, we performed AXL immunostaining in both mouse models (Fig. 7c). AXL expression was high in ductal adenocarcinomas, while it was barely detected in precursor lesions from the KRAS model. In contrast, acinar tumours from MYC mice were negative, indicating that sAXL is specifically overexpressed in PDAC.

In sum, results from KRAS or MYC mouse models of pancreatic cancer demonstrated that sAXL and GAS6 were specifically increased in plasma of animals with ductal adenocarcinomas but not in those with precursor lesions or acinar tumours, confirming the accuracy of circulating sAXL for early diagnosis of PDAC.

Discussion

Early diagnosis of pancreatic cancer is an unmet challenge in clinical oncology. Here, we show that detection of sAXL in plasma samples represents a novel biomarker for PDAC diagnosis at initial stages (e.g., still resectable) of the disease. Moreover, plasma sAXL levels can discriminate PDAC from CP, a major risk factor for PDAC, with a better accuracy than the CA19-9 biomarker currently used in the clinic. In fact, our data support that blood detection of sAXL and CA19-9 panel by ELISA represents a good strategy for early detection of PDAC. Overexpression of AXL is frequent in cancer, both in hematologic and solid tumours, and plays a crucial role in malignant progression through activation of cell growth, metastasis, angiogenesis, immune evasion, and therapy resistance.^{42–49} Therefore, inhibition of AXL has emerged as a potential novel therapeutic target in oncology. In pancreatic cancer, the role of AXL in tumour biology has been less characterized. Histopathological studies have shown an overexpression of AXL in a subset of PDAC patient samples and cell lines that is associated to increased tumour cell invasion and poor prognosis.^{17,18} These findings led to the proposal of targeting AXL as a novel therapy for this tumour.^{17,50} Here, we analysed AXL expression by IHC in normal versus pathological pancreas, including CP, precursor lesions (PanIN and IPMN), and PDAC samples. We found that normal pancreas and CP showed almost undetectable levels of AXL, while its expression was high in PDAC and IPMNs, and moderate in PanINs. Intriguingly, we found several cancer samples with low or even no AXL staining, suggesting that activation of AXL expression can be differentially regulated in PDAC subtypes. Interestingly, our analyses from TCGA RNA datasets indicate that AXL expression in PDAC patients is related to specific genetic signatures, being overrepresented in the basal/squamous subgroups, according to the recent genomic classification of PDAC.^{4–7} Moreover, the high AXL expression in IPMNs suggests that

AXL^{high} tumours may arise, at least in part, from these preneoplastic lesions.

The molecular mechanisms leading to AXL overexpression in cancer have not been fully elucidated.⁵¹ Genomic amplifications or activating mutations in AXL gene have been rarely found,^{52,53} suggesting that AXL expression in PDAC is controlled by other transcriptional mechanisms or by translational or post-translational regulation.^{54,55} In other tumours, several transcription factors have been reported to bind AXL promoter and induce transcription, including the hypoxia-inducible factor-1 (HIF1).^{56,57} Notably, hypoxia is one of the major hallmarks of PDAC,⁵⁸ which makes it plausible that the different AXL expression level observed in pancreatic tumours may be related to their hypoxic state. Importantly, PDAC is characterized by a high both intertumoural and intratumoural genetic heterogeneity, which may contribute to different AXL expression levels found in these tumours. Indeed, our TCGA analysis, as well as previous studies,⁵⁴ have shown that high AXL levels associate with squamous-type tumours. Moreover, invasive cells in the periphery of the tumour show the highest levels of AXL within a given lesion.⁴¹ Future studies to better elucidate the contribution of hypoxia, tumour genetic heterogeneity and/or other mechanisms to the variable expression of AXL in PDAC are certainly warranted.

The transmembrane receptor AXL can be proteolytically cleaved to generate a soluble form (sAXL) that can be secreted into the blood stream, suggesting its putative use as a cancer biomarker.⁴² Here we found that sAXL is significantly increased in plasma samples from patients with PDAC, but not with CP, in two independent cohorts. In accordance with our results in tissue samples and TCGA data, we also found heterogeneity regarding the levels of circulating sAXL among different patients. Importantly, sAXL was found in the conditioned medium from several human PDAC cell lines, indicating that increased levels of sAXL in blood from PDAC patients is likely released by tumour cells. Remarkably, increased sAXL did not correlate with tumour staging in our cohorts, indicating that AXL overexpression is an early event in cancer progression. Notwithstanding, data from our cohorts and the TCGA showed a negative correlation between AXL levels and overall patient survival. Although TCGA RNA data are difficult to interpret and have important limitations, this could be related to the fact that AXL^{high} tumours may correspond to the basal/squamous PDAC subtype, which are poorly differentiated tumours with lower prognosis. In agreement with these data, Du *et al.* have recently reported that pancreatic tumours with high AXL expression have a squamous phenotype displaying markers of epithelial-to-mesenchymal transition, and that inhibition of AXL in mouse models results in more differentiated tumours and increased survival.⁵⁴ We also analysed a cohort of healthy high-risk people from

familial pancreatic cancer families that includes young patients with germline genetic mutations linked to PDAC development. sAXL plasma levels in these individuals were similar to healthy controls, indicating that they were disease-free at that moment. These results agree with clinical history and data from imaging techniques performed during the extensive follow-up of this high-risk cohort, which showed that these individuals had non-PDAC pancreatic lesions. In turn, this independently validates the use of sAXL for detection of the occurrence of PDAC, already elevated at initial PDAC stages, while not in patients with precursor lesions. Moreover, using a KRAS-driven murine PDAC model that fully recapitulates human disease,¹¹ we demonstrated that sAXL is significantly increased in plasma from animals that develop frank pancreatic tumours but not in mice with normal pancreas or with early precursor lesions. Moreover, analysis of plasma samples from mice of a c-MYC-driven PDAC model³² with acinar carcinomas showed no increases in sAXL levels as compared to control mice, indicating that sAXL is a specific biomarker for ductal adenocarcinoma and is not overexpressed in other pancreatic tumour types.

One of the main findings of this study is that sAXL is a blood biomarker specifically overexpressed in PDAC tumours and not in CP, thereby emerging as a promising diagnostic tool for discriminating between these two diseases. CP is an important public health problem that has been related to PDAC initiation.^{11,59} Diagnostic accuracy for CP is low, in particular for advanced cases, when architectural changes of the gland renders difficult to differentiate inflammatory regions from PDAC by imaging techniques.⁶⁰ At the level of clinical symptoms, both are silent diseases with non-specific and vague manifestations. Non-invasive diagnostic tools for either CP or PDAC include anatomic imaging techniques – mainly endoscopic ultrasound and radiological studies –, pathology tissue studies, and blood tests. However, despite recent advances in this field, combinations of several of these techniques are usually required.^{61,62} Here, using two different cohorts, we found that blood levels of sAXL were significantly increased in PDAC patients as compared to patients with CP or healthy controls. Increased levels of sAXL and its ligand GAS6 have been also reported in hepatocellular carcinoma (HCC), although, in contrast to PDAC, they are also increased in inflammatory conditions like cirrhosis and advanced fibrosis.^{63–67} Remarkably, although AXL is highly expressed by myofibroblasts in HCC, we found AXL expression specifically in ductal tumour cells but not in the stroma (Fig. 1a), indicating that fibroblasts in liver and pancreas behave differentially with respect to AXL expression and activity and may be responsible for the increased sAXL found in hepatic cirrhosis and fibrosis.

Blood tests for early disease diagnosis offer the advantages of their straightforward performance, fast

results, and low cost. CA19-9, the sialylated form of Lewis antigen A, is the best-recognized blood test for PDAC diagnosis but has limitations.⁸ First, high levels of this carbohydrate are found in several non-malignant pathologies, such as obstructive and inflammatory diseases of the hepato-pancreatobiliary system, leading to false positives.⁶⁸ Second, CA19-9 levels are also increased in other gastrointestinal tumours, including colorectal cancer and HCC.^{9,64–67,69–71} Moreover, using CA19-9 can give false negative results in the Lewis blood-type negative population (around 10% of the White population). Therefore, clinical utility of CA19-9 for PDAC diagnosis is suboptimal, and identification of more specific and sensitive biomarkers is urgently needed. Importantly, our ROC analysis showed that sAXL detection in plasma (AUC, 0.827) has a higher sensitivity (65%) and specificity (100%) for discriminating PDAC from CP than CA19-9 (AUC, 0.673; sensitivity 46.8%, specificity 92.3%). Indeed, plasma sAXL values in CP patients are similar to healthy controls, indicating that this protein is a more specific biomarker for PDAC than the currently used CA19-9. Importantly, combined determination of CA19-9 and sAXL plasma levels contributed to an increased accuracy of diagnosis (89.9% sensitivity; 100% specificity), reducing the proportion of false negatives.

Our study presents some limitations. First, we found high variability regarding the levels of AXL in plasma and tissue samples from PDAC patients. We found a small proportion of patients who showed sAXL levels similar to healthy individuals, leading to false negatives. This heterogeneity in AXL expression emphasizes the need to combine several biomarkers for a precise PDAC diagnosis. Indeed, our results using the combination of sAXL and CA19-9 significantly improved the discriminatory power of a single determination of sAXL for CP vs PDAC (in HClinic cohort, 65% sensitivity for sAXL alone versus 89.9% for sAXL combined with CA19-9). Emerging data have also shown improved specificity and sensitivity of combining blood detection of CA19-9 with thrombospondin-2⁷² or with MUC5AC.⁷³ Along the same line, the use of nine metabolites plus CA19-9 was recently reported to be an accurate (>90%) biomarker signature for discriminating CP and PDAC.⁷⁴ In a previous study, using the same HMar, we showed that plasma levels of galectin-1 (Gal-1) were increased in PDAC as compared to healthy controls; however, high levels of this protein were also found in patients with CP, limiting its effectiveness as a diagnostic biomarker for PDAC.²⁸ Strikingly, a combination of sAXL, Gal-1, and CA19-9 resulted in an increased diagnostic accuracy (100% sensitivity and 100% specificity for PDAC vs healthy controls; Table S8), suggesting that ELISA detection using this panel can be optimal for diagnosis of these diseases. Another limitation of our study is the fact that circulating sAXL is also upregulated in HCC^{64–67} and in non-cancer related diseases, including

heart failure, chronic kidney disease, and rheumatoid arthritis,⁷⁵ which can lead to false positives, hampering its use as a general screening biomarker. Still, given the low prevalence of PDAC in the general population, the most sustainable option for the healthcare system is to screen the PDAC high-risk populations (i.e. germline mutations, PDAC familial aggregation, and CP patients) to allow early detection and curative treatments. We suggest that detection of sAXL in combination with CA19-9 in this PDAC-suspected population might represent a low-cost/high-accuracy screening tool (91.3% sensitivity, 100% specificity) that can contribute to 30%-40% increase of patient's survival by early detection of the pathology. Finally, the limited size of the two cohorts used in our study makes necessary to implement multicentric studies with larger cohorts in order to establish accurate sAXL cut-off values that can be transferred to the clinical setting, both for PDAC diagnosis and for CP discrimination.

In conclusion, by analysing sAXL and GAS6 in human plasma from patients with PDAC or CP, this study demonstrated that sAXL is a *bona fide* biomarker for PDAC early diagnosis and for PDAC-CP discrimination. Our data indicated that ELISA measurement of sAXL in a patient's plasma represents a novel cost-effective test with high specificity and sensitivity, superior to CA19-9 in discriminating PDAC and CP. In addition, combination of CA19-9 and sAXL can achieve great diagnosis accuracy for both PDAC vs healthy controls (91.3% sensitivity; 100% specificity) and PDAC vs CP (89.9% sensitivity; 100% specificity). Moreover, our data on high sAXL levels in the basal/squamous PDAC subtype suggest that this biomarker can be particularly useful for diagnosis in genetically defined subsets of patients, highlighting its putative use in personalized medicine. Therefore, sAXL gives an added diagnostic value and is a suitable biomarker in the clinical management of PDAC patients, with a chance for a drastic improvement in overall survivability of this dismal disease.

Contributors

Conceptualization: Pilar Navarro and Pablo García de Frutos. Investigation: Neus Martínez-Bosch, Helena Cristóbal, Domenico Calafato, Noemí Manero-Rupérez and Mireia Moreno. Formal analysis and resources: Neus Martínez-Bosch, Helena Cristóbal, Mar Iglesias, Meritxell Gironella, Luis Barranco, Laura Visa, Domenico Calafato, Silvia Jiménez-Parrado, Julie Earl, Alfredo Carrato, Albert Morales, Carmen Guerra, Pilar Navarro, and Pablo García de Frutos. Funding acquisition: Pilar Navarro, Pablo García de Frutos, Albert Morales, Meritxell Gironella and Alfredo Carrato. Supervision, data curation and writing the original draft: Pilar Navarro and Pablo García de Frutos. All authors read and approved the final draft.

Declaration of interests

The authors have declared that no competing interest exists.

Acknowledgements

We thank Dr. X. Duran for help with the statistical analysis; the Bioinformatics Unit of MARGenomics (Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain) for assistance with bioinformatics data analysis and V.A. Raker for English proofreading and manuscript editing. We also thank patients and their families as well as nurses for sample collection. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN)/ Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-European Regional Development Fund (ERDF) (PI20/00625) and the "Generalitat de Catalunya" (2017/SGR/225) to PN; grants from the MICINN (Project# RTI2018-095672-B-I00) to AM and PGdF; grant from the MICINN/ISCIII-FEDER (PI20/01696) to MG and grant from the MICINN/ISCIII-FEDER (PI18/01034) to AC. We also acknowledge grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)/ERDF (PT20/00023) and the "Xarxa de Bancs de tumours" sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC). PN's lab is part of Redes de investigación (Enfermedades Metabólicas y Cáncer RED2018-102799-T), a project run by MINECO. CIBEREHD is funded by Instituto de Salud Carlos III.

Data sharing statement

The data generated during the study to support the findings are available upon request from the corresponding authors (Dr. Pilar Navarro and Dr. Pablo García de Frutos) upon reasonable request.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ebiom.2021.103797.

References

- Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, et al. Addressing the challenges of pancreatic cancer: Future directions for improving outcomes. *Pancreatol* 2015;15(1):8-18. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2014.10.001>.
- Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2014;371(11):1039-49. <https://doi.org/10.1056/NEJMa1404198>.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021;71(1):7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>.
- Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 2015;47(10):1168-78. <https://doi.org/10.1038/ng.3398>.
- Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* 2011;17(4):500-3. <https://doi.org/10.1038/nm.2344>.

- 6 Bailey P, Chang DK, Nones K, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 2016;531(7592):47–52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>.
- 7 Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: andrew_aguirre@dfci.harvard.edu, Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2017;32(2):185–203. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.007>. e13.
- 8 Zhang Y, Yang J, Li H, Wu Y, Zhang H, Chen W. Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(7):11683–91.
- 9 Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R, et al. Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2010;21(3):441–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp332>.
- 10 Al-Shaheri FN, Alhamdani MSS, Bauer AS, et al. Blood biomarkers for differential diagnosis and early detection of pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev* 2021;96:102193. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102193>.
- 11 Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007;11(3):291–302. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012>.
- 12 Conwell DL, Lee LS, Yadav D, et al. American pancreatic association practice guidelines in chronic pancreatitis: evidence-based report on diagnostic guidelines. *Pancreas* 2014;43(8):1143–62. <https://doi.org/10.1097/MPA.000000000000237>.
- 13 Beyer G, Habtezion A, Werner J, Lerch MM, Mayerle J. Chronic pancreatitis. *Lancet (London, England)* 2020;396(10249):499–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31318-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31318-0).
- 14 Brezgyte G, Shah V, Jach D, Crnogorac-Jurcevic T. Non-invasive biomarkers for earlier detection of pancreatic cancer—a comprehensive review. *Cancers (Basel)* 2021;13(11). <https://doi.org/10.3390/cancers13112722>.
- 15 Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(11):a009076. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009076>.
- 16 Burstyn-Cohen T, Maimon A. TAM receptors, Phosphatidyserine, inflammation, and Cancer. *Cell Commun Signal* 2019;17(1):156. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0461-0>.
- 17 Koorstra J-B, Karikari CA, Feldmann G, et al. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 2009;8(7):618–26. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.7.7923>.
- 18 Song X, Wang H, Logsdon CD, et al. Overexpression of receptor tyrosine kinase Axl promotes tumor cell invasion and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer* 2011;117(4):734–43. <https://doi.org/10.1002/cncr.25483>.
- 19 Du W, Phinney NZ, Huang H, et al. AXL Is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res April* 2021. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0860>.
- 20 Ludwig KF, Du W, Cruz VH, et al. Small-molecule inhibition of axl targets tumor immune suppression and enhances chemotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2017;78(1):246–55. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-1973>.
- 21 Ekman C, Stenhoff J, Dahlbäck B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost* 2010;8(4):838–44. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03752.x>.
- 22 Ekman C, Linder A, Akesson P, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care* 2010;14(4):R158. <https://doi.org/10.1186/cc9233>.
- 23 Ekman C, Gottsäter A, Lindblad B, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 and soluble Axl correlate with disease and predict mortality in patients with critical limb ischemia. *Clin Biochem* 2010;43(10-11):873–6. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.04.006>.
- 24 Batlle M, Recarte-Pelz P, Roig E, et al. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 2014;173(3):402–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.03.016>.
- 25 Ekman C, Site DF, Gottsäter A, Lindblad B, Dahlbäck B. Plasma concentrations of growth arrest specific protein 6 and the soluble form of its tyrosine kinase receptor Axl as markers of large abdominal aortic aneurysms. *Clin Biochem* 2010;43(1-2):110–4. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.07.025>.
- 26 Liu X, Gong Y, Jia J, et al. Plasma concentrations of sAxl are associated with severe preeclampsia. *Clin Biochem* 2014;47(3):173–6. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.11.001>.
- 27 Lee IJ, Hilliard BA, Ulas M, et al. Monocyte and plasma expression of TAM ligand and receptor in renal failure: Links to unregulated immunity and chronic inflammation. *Clin Immunol* 2015;158(2):231–41. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.01.012>.
- 28 Martinez-Bosch N, Barranco LE, Orozco CA, et al. Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: Potential use as biomarker. *Oncotarget* 2018;9(68):32984–96. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26034>.
- 29 Vila-Navarro E, Duran-Sanchon S, Vila-Casadesús M, et al. Novel circulating miRNA signatures for early detection of pancreatic neoplasia. *Clin Transl Gastroenterol* 2019;10(4):e00029. <https://doi.org/10.14309/ctg.000000000000029>.
- 30 Mocchi E, Guillen-Ponce C, Earl J, et al. PanGen-Fam: Spanish registry of hereditary pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2015;51(14):1911–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.07.004>.
- 31 Guerra C, Barbacid M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Oncol* 2013;7(2):232–47. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.002>.
- 32 Sandgren EP, Quaipe CJ, Paulovich AG, Palmiter RD, Brinster RL. Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88(1):93–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.1.93>.
- 33 Guerra C, Collado M, Navas C, et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 2011;19(6):728–39. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.011>.
- 34 Orozco CA, Martinez-Bosch N, Guerrero PE, et al. Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor–stroma crosstalk. *Proc Natl Acad Sci* 2018;115(16):E3769–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722434115>.
- 35 Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A quickscore method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995;48(9):876–8. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.9.876>.
- 36 Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 2010;11(3):R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>.
- 37 Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res* 2017;45(W1):W98–W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>.
- 38 Ayars M, O'Sullivan E, Macgregor-Das A, et al. IL2RG, identified as overexpressed by RNA-seq profiling of pancreatic intraepithelial neoplasia, mediates pancreatic cancer growth. *Oncotarget* 2017;8(48):83370–83. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19848>.
- 39 Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J, et al. Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(31):12890–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705505104>.
- 40 Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, et al. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012;7(12):e51862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051862>.
- 41 Leconet W, Larbouret C, Chardès T, et al. Preclinical validation of AXL receptor as a target for antibody-based pancreatic cancer immunotherapy. *Oncogene* 2014;33(47):5405–14. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.487>.
- 42 Gay CM, Balaji K, Byers LA. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br J Cancer* 2017;116(4):415–23. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.428>.
- 43 Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(3):1124–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909331107>.
- 44 Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1997;17(8):4442–53. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.8.4442>.
- 45 Goyette MA, Duhamel S, Aubert L, et al. The receptor tyrosine kinase AXL is required at multiple steps of the metastatic cascade during HER2-positive breast cancer progression. *Cell Rep* 2018;23(5):1476–90. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.019>.
- 46 Loges S, Schmidt T, Tjwa M, et al. Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6. *Blood* 2010;115(11):2264–73. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-228684>.

- 47 Zhang Z, Lee JCJ-S, Lin L, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet* 2012;44(8):852–60. <https://doi.org/10.1038/ng.2330>.
- 48 Zhou L, Liu X-D, Sun M, et al. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2016;35(21):2687–97. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.343>.
- 49 Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 2014;5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6712>.
- 50 von Itzstein MS, Burke MC, Brekken RA, et al. Targeting TAM to tame pancreatic cancer. *Target Oncol* 2020;15(5):579–88. <https://doi.org/10.1007/s11523-020-00751-9>.
- 51 Scaltriti M, Elkabets M, Baselga J. Molecular pathways: AXL, a membrane receptor mediator of resistance to therapy. *Clin Cancer Res* January 2016. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1458>.
- 52 Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012;2(5):401–4. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>.
- 53 Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013;6(269):pl1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>.
- 54 Du W, Brekken RA. Does Axl have potential as a therapeutic target in pancreatic cancer? *Expert Opin Ther Targets* 2018;22(11):955–66. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1527315>.
- 55 Zhu C, Wei Y, Wei X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: Functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer* 2019;18(1):153. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1090-3>.
- 56 Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, et al. Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(37):13373–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404848111>.
- 57 Nalwoga H, Ahmed L, Ames JB, Wabinga H, Aklsen LA. Strong expression of Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is associated with axl expression and features of aggressive Tumors in African breast cancer. *PLoS One* 2016;11(1):e0146823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146823>.
- 58 Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, et al. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9(8):454–67. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.115>.
- 59 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993;328(20):1433–7. <https://doi.org/10.1056/NEJM199305203282001>.
- 60 Duggan SN, Ni Chonchubhair HM, Lawal O, O'Connor DB, Conlon KC. Chronic pancreatitis: A diagnostic dilemma. *World J Gastroenterol* 2016;22(7):2304–13. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i7.2304>.
- 61 Dimastromatteo J, Brentnall T, Kelly KA. Imaging in pancreatic disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14(2):97–109. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.144>.
- 62 Zhang Q, Zeng L, Chen Y, et al. Pancreatic cancer epidemiology, detection, and management. *Gastroenterol Res Pract* 2016;2016:8962321. <https://doi.org/10.1155/2016/8962321>.
- 63 Bárcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, et al. Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *J Hepatol* 2015;63(3):670–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.04.013>.
- 64 Reichl P, Fang M, Starlinger P, et al. Multicenter analysis of soluble Axl reveals diagnostic value for very early stage hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2015;137(2):385–94. <https://doi.org/10.1002/ijc.29394>.
- 65 Stauffer K, Dengler M, Huber H, et al. The non-invasive serum biomarker soluble Axl accurately detects advanced liver fibrosis and cirrhosis. *Cell Death Dis* 2017;8(10):e3135. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.554>.
- 66 Dengler M, Stauffer K, Huber H, et al. Soluble Axl is an accurate biomarker of cirrhosis and hepatocellular carcinoma development: results from a large scale multicenter analysis. *Oncotarget* 2017;8(28):46234–48. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17598>.
- 67 Tutusaus A, de Gregorio E, Cucarull B, et al. A Functional Role of GAS6/TAM in nonalcoholic steatohepatitis progression implicates AXL as therapeutic target. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020;9(3):349–68.
- 68 Ventrucci M, Pozzato P, Cipolla A, Uomo G. Persistent elevation of serum CA 19-9 with no evidence of malignant disease. *Dig Liver Dis* 2009;41(5):357–63. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.04.002>.
- 69 Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* 1981;212(4490):53–5. <https://doi.org/10.1126/science.6163212>.
- 70 Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2007;33(3):266–70. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.10.004>.
- 71 Thomsen M, Skovlund E, Sorbye H, et al. Prognostic role of carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in metastatic colorectal cancer: a BRAF-mutant subset with high CA 19-9 level and poor outcome. *Br J Cancer* 2018;118(12):1609–16. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0115-9>.
- 72 Kim J, Bamlet WR, Oberg AL, et al. Detection of early pancreatic ductal adenocarcinoma with thrombospondin-2 and CA19-9 blood markers. *Sci Transl Med* 2017;9(398). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah5583>.
- 73 Kaur S, Smith LM, Patel A, et al. A Combination of MUC5AC and CA19-9 improves the diagnosis of pancreatic cancer: a multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2017;112(1):172–83. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.482>.
- 74 Mayerle J, Kalthoff H, Reszka R, et al. Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gut* 2018;67(1):128–37. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312432>.
- 75 Sainaghi PP, Bellan M, Nerviani A. Role of the Gas6/TAM system as a disease marker and potential drug target. *Dis Markers* 2021;2021:1–3. <https://doi.org/10.1155/2021/2854925>.

Supplemental Data

Table S1. Clinical characteristics of all patients whose tissue or plasma samples have participated in the study.

Group	ALL	Ctl	CP	PanIN	IPMN	PDAC
Tissue Expression						
n	67	11	14	13	12	17
Age*	73.0(63.0-78.0)	69.0(44.0-77.0)	70.0(63.0-74.3)	75.0(54.5-78.0)	74.0(65.8-78.8)	70.0(63.0-81.5)
Sex						
Male	43	9	9	9	6	10
Female	24	2	5	4	6	7
HMar Cohort						
n	59	7	21			31
Age*	67.0 (55.0-77.0)	56.0 (51.0-63.0)	55.0(46.50-68.0)			74.0(67.0-81.0)
Sex						
Male	37	4	16			17
Female	22	3	5			14
Diabetes						
Unknown	1	1	0			0
No	36	5	15			16
Yes	22	1	6			15
Obstructive Jaundice						
Unknown	8	5	3			0
No	41	2	18			21
Yes	10	0	0			10
HClinic Cohort						
n	142	46	46			80
Age*	62.5(52.0-72.0)	57.0(51.75-67.0)	49.50(45.0-65.75)			67.0(54.25-76.0)
Sex						
Male	81	23	13			45
Female	61	23	3			35
Diabetes						
Unknown	17	0	3			14
No	84	38	9			35
Yes	41	8	4			31
Obstructive Jaundice						
Unknown	38	16	4			18
No	86	30	7			49
Yes	18	0	5			13

*Age is expressed as the median and interquartile range (Q25-Q75).

Table S2. AXL expression and clinico-pathological characteristics of PDAC tissue samples.

Tissue	<i>n</i>	Median AXL (Q25-Q75)	<i>p</i>				
Age	67	20.0 (0.0-50.0)					
Gender							
Male	43	10.0 (0.0-50.0)					
Female	24	40.0 (1.3-115.0)		ns			
Pathology							
				<i>p</i> (vs Ctl)	<i>p</i> (vs CP)	<i>p</i> (vs PanIN)	<i>p</i> (vs IPMN)
Ctl	11	0.0 (0.0-0.0)					
CP	14	7.5 (5.0-40.0)		<0.0001			
PanIN	13	10.0 (0.0-150.0)		0.026	ns		
IPMN	12	45.0 (25.0-122.5)		<0.0001	0.002	ns	
PDAC	17	50.0 (10.0-120.0)		<0.0001	0.017	ns	ns
Stage							
				ns (KW)			
I	1	10.0 (-)					
II	15	50.0 (10.0-120.0)		ns			
III	0	- (-)		-			
IV	1	50.0 (-)		ns			

CP, chronic pancreatitis; Ctl, control; IPMNs, intraductal papillary mucinous neoplasms; KW, Kruskal Wallis; ns, non-significant; PanIN, pancreatic intraepithelial neoplasias; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; Q, quartile; vs, versus. Unless otherwise specified, *p* values are calculated with Mann Whitney test.

Table S3. sAXL, GAS6 and CA19-9 plasma values and clinico-pathological data from HMar cohort.

	<i>n</i>	Median sAXL (Q25-Q75)	<i>p</i>	Median GAS6 (Q25-Q75)	<i>p</i>	Median CA19-9 (Q25-Q75)	<i>p</i>
Age	59	55.27 (41.49-66.18)		15.65 (11.90-20.42)		38.15 (10.00-428.80)	
Gender							
Male	37	55.48 (42.06-66.25)		16.61(11.90-22.12)		31.9(9.13-362.93)	
Female	22	54.83 (38.79-66.49)	ns	13.82(11.42-17.49)	ns	154.75(15.98-525.20)	ns
Pathology							
Ctl	7	39.45(37.00-50.02)		11.47(9.94-12.73)		9.00(4.80-27.20)	
CP	21	44.82(38.92-60.68)	ns	15.88(10.91-18.80)	0.062	13.3(9.60-34.53)	ns
PDAC	31	59.78(49.37-74.75)	0.002 0.003 (vs CP)	15.88(13.26-23.88)	0.002 ns vs CP	405.1(170.75-860.70)	0.001 1 (vs CP)
Stage			ns (KW)		ns (KW)		ns (KW)
I	2	50.93		11.98		2.3	
II	9	58.23(46.24-68.40)	ns all	15.88(14.51-23.50)	ns all	376.1(176.75-717.20)	0.036
III	4	60.28(49.43-78.58)	ns all	18.00(15.58-23.01)	ns all	279.05(168.58-442.25)	0.064
IV	14	59.03(47.58-77.43)	ns all	14.09(11.74-23.75)	ns all	651.15(230.78-5548.50)	0.039

Ctl, control; CP, chronic pancreatitis; KW, Kruskal-Wallis; ns, non-significant; ns all, all possible combinations are not significant; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; Q, quartile; vs, versus. *p* values refer to Mann Whitney test, unless otherwise specified.

Table S4. sAXL, GAS6 and CA19-9 plasma values and clinico-pathological data from HClinic cohort.

	<i>n</i>	Median sAXL (Q25-Q75)	<i>p</i>	Median GAS6 (Q25-Q75)	<i>p</i>	Median CA19-9 (Q25-Q75)	<i>p</i>
Age	142	43.78(35.06-55.55)		15.00(10.67-21.30)		25.00 (7.00-263.00)	
Gender							
Male	81	45.65(36.13-56.05)		15.00(10.29-22.19)		25.00(7.50-204.00)	
Female	61	42.97(32.54-51.80)	ns	15.00(10.77-19.92)	ns	24.50(6.00-297.00)	ns
Pathology							
Control	46	40.03(31.50-45.63)		12.66(10.30-16.26)		8.00(4.75-12.50)	
CP	16	36.34(29.97-41.02)	0.061	10.31(7.74-14.17)	0.09	50.00(18.50-253.50)	<0.0001
PDAC	80	52.66(40.24-70.32)	<0.0001 <0.00018 (vs CP)	18.14(12.25-28.60)	<0.0001 0.001 (vs CP)	158.00(24.25- 496.50)	<0.0001 ns(vs CP)
Stage							
I	15	52.61 (38.78- 63.45)	ns (KW)	18.03(10.77-23.66)	ns (KW)	78.00(25.00-171.00)	ns (KW)
II	13	66.90(52.64-91.88)	0.052 (vs I)	28.66(21.32-38.32)	0.015 (vs I)	134.00(45.00- 408.00)	ns
III	19	44.52(34.67-72.63)	ns (vs I) 0.018 (vs II)	16.04(10.86-29.47)	ns (vs I) 0.049 (vs II)	194.00(11.25- 585.50)	ns
IV	22	52.25(42.41-68.72)	ns (vs I) 0.034 (vs II) ns (vs III)	18.09(15.03-29.18)	ns (vs I) 0.024 (vs II) ns (vs III)	473.00(21.00- 995.00)	ns

CP, chronic pancreatitis; KW, Kruskal-Wallis; ns, non-significant; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; Q, quartile; vs, versus. *p* values refer to Mann Whitney test, unless otherwise specified.

Table S5. Multivariate analysis of HClinic cohort sAXL, GAS6 and CA19-9 between groups, adjusted for gender, age, diabetes and obstructive jaundice.

	Coefficient	[95% Confidence	Interval]	p-value
sAXL				
Ctl	0.00			
CP	-1.05	-14.43	12.32	0.876
PDAC	14.50	5.74	23.26	0.001
PDAC	0.00			
CP	-15.55	-27.73	-3.37	0.013
Ctl	-14.50	-23.26	-5.74	0.001
Obstructive Jaundice				
No	0.00			
Yes	3.27	-6.90	13.44	0.525
Gender				
Female	0.00			
Male	5.99	-1.39	13.37	0.111
Age	-0.19	-0.51	0.13	0.235
Diabetes	1.51	-6.21	9.23	0.698
GAS6				
Ctl	0.00			
CP	-3.03	-9.20	3.15	0.333
PDAC	5.07	1.02	9.11	0.015
PDAC	0.00			
PC	-8.10	-13.72	-2.47	0.005
Ctl	-5.07	-9.11	-1.02	0.015
Obstructive Jaundice				
No	0.00			
Yes	3.66	-1.04	8.36	0.125
Gender				
Female	0.00			
Male	1.74	-1.67	5.15	0.313
Age	-0.05	-0.19	0.10	0.505
Diabetes	1.60	-1.96	5.17	0.375
CA19-9				
Ctl	0.00			
CP	93.21	-245.52	431.93	0.586
PDAC	249.80	36.31	463.29	0.022

PDAC	0.00			
PC	-156.60	-465.80	152.61	0.317
Ctl	-249.80	-463.29	-36.31	0.022
Obstructive Jaundice				
No	0.00			
Yes	-86.83	-337.15	163.48	0.493
Gender				
Female	0.00			
Male	-7.65	-187.61	172.31	0.933
Age	0.43	-7.29	8.15	0.912
Diabetes	-21.17	-209.93	167.59	0.824

CP, chronic pancreatitis; Ctl, control.

Table S6. Description of clinico-pathological characteristics of the familial/hereditary cohort of PDAC (attached separately as an excel file).

SEX	AGE	Sample type	DATE OF DIAGNOSIS	Sporadic/FPC	family phenotype	STAGE	HISTOLOGICAL TYPE	LOCATION	size	TNM	Grade
FEMALE	72	Pre-treatment	20/12/2017	SP		R	PDAC	HEAD	37mm	pT3 pN2M0	G2
MALE	80	Pre-treatment	08/03/2018	FPC	FPC	R	PDAC	BODY-TAIL	8x4x3 cm	pT3N2M0	G3
MALE	66	Pre-treatment	01/03/2018	SP		R	PDAC	BODY	22mm	pT3 N0	G1
FEMALE	84	Pre-treatment	11/04/2018	FPC	FPC	R	PDAC	BODY	3.2 x 2 x 1.5 cm	pT2 N2M0	G2
FEMALE	57	Pre-treatment	06/04/2018	SP		R	PDAC	HEAD	2.5 cm	pT2N0M0	G2
MALE	64	Pre-treatment	08/06/2018	SP		R	PDAC	HEAD	25 mm	pT2N1Mx	G3
FEMALE	74	Pre-treatment	24/05/2018	SP		R	PDAC	TAIL	14x18 mm	pT2N1	G2
MALE	71	Pre-treatment	11/07/2018	SP		R	PDAC	HEAD	53mm	pT3 pN2	G1
FEMALE	76	Pre-treatment	25/07/2018	SP		R	PDAC	HEAD	27mm	pT2N2M0	G2
MALE	69	Pre-treatment	19/07/2018	SP		R	PDAC	HEAD	20x30 mm	pT1c pN2	G2
FEMALE	76	Pre-treatment	18/09/2018	SP		R	PDAC	HEAD	1.5 x 1.4 cm	pT1c pN0 M0	
MALE	61	Pre-treatment	04/12/2018	SP		R	Mucinous Neoplasm with CP	HEAD	8 x 7 cm	pT2N0	
MALE	69	Pre-treatment	29/01/2019	SP		R	PDAC	HEAD	25 x 19 mm	pT2 pN1	G2
FEMALE	75	Pre-treatment	14/02/2019	SP		R	PDAC	TAIL	27 x 20 mm	pT2 pN1	G1
MALE	63	Pre-treatment	18/03/2019	SP		R	PDAC	HEAD	16x28 mm	pT2 pN1	G2
FEMALE	65	Pre-treatment	06/05/2019	SP		R	PDAC	HEAD	1.6x1.4x1.3 cm	pT1c/pN0	G1
FEMALE	80	Pre-treatment	16/05/2019	SP		M	PDAC	BODY	23 mm		G2
FEMALE	65	Pre-treatment	09/04/2019	SP		R	PDAC	HEAD-NECK	22x17x12 mm	pT2 pN2M0	G2
MALE	63	Pre-treatment	25/10/2013	SP		R	PDAC	HEAD	3,6 x 1,7 cm	pT3 N1 Mx	G3
MALE	67	Pre-treatment	02/08/2012	FPC	HBOC + PC	R	PDAC	HEAD	1,5 cm - 2 cm	pT3 N0 M0	G3
FEMALE	56	Entry	09/08/2017	High risk	FPC	Follow-up	Pancreatic cyst				
FEMALE	51	Entry	16/08/2017	High risk	FPC	Follow-up	IPMN				

MALE	81	Entry		31/10/2011	high risk	FPC		Follow-up	IPMN			
MALE	70	Entry		10/10/2011	high risk	FPC		Follow-up	Pancreatic cyst			
FEMALE	46	Entry		07/03/2012	high risk	FPC		Follow-up	pNET			
		Post resection pNET						Follow-up				
FEMALE	37	Entry		03/07/2014	high risk	FPC		Follow-up	Pancreatic cysts			
		Post detection Cyst						Follow-up				
MALE	57	Entry		14/02/2012	high risk	FPC		Follow-up				
FEMALE	53	Entry		21/04/2014	high risk	FPC		Follow-up	Pancreatic cyst			
MALE	53	Entry		13/01/2014	high risk	HBOC + PC <=50 Y		Follow-up	Pancreatic cyst			
		Entry						Follow-up				
		Post detection Cyst						Follow-up				
MALE	45	Entry		12/11/2012	high risk	HBOC + PC <=50 Y		Follow-up	Pancreatic cyst			
FEMALE	46	Entry		23/06/2014	high risk	FPC		Follow-up	PDAC			
		Post resection carcinoma						Follow-up				
FEMALE	41	Entry		22/12/2014	high risk	FPC		Follow-up	IPMNs	s		
MALE	48	Entry		20/04/2016	high risk	FPC		Follow-up	Pancreatic cyst			
FEMALE	61	Entry		22/03/2013	high risk	HBOC + PC		Follow-up				
FEMALE	40	Entry		08/06/2015	high risk	FPC		Follow-up	Solid lesion			
		Post resection carcinoma						Follow-up				
FEMALE	39	Entry		08/06/2015	high risk	FPC		Follow-up	IPMN			
FEMALE	73	Entry		22/10/2014	high risk	FPC		Follow-up	IPMN			
MALE	59	Entry		01/10/2015	high risk	FPC		Follow-up	IPMN/cyst			
FEMALE	60	Entry		29/06/2015	high risk	FPC		Follow-up	Pancreatic cyst			
FEMALE	77	Entry		08/06/2015	high risk	FPC		Follow-up	IPMN			
FEMALE	68	Entry		08/06/2015	high risk	FPC		Follow-up	Pancreatic cyst			
MALE	59	Entry		02/01/2019	high risk	FPC		Follow-up	Pancreatic cyst			

Table S7. ROC analysis of sAXL, GAS6 and CA19-9 plasma values in HMar and HClinic cohort.

ROC	Ctl-CP			CP-PDAC			Ctl-PDAC		
	AUC	SE	<i>p</i>	AUC	SE	<i>p</i>	AUC	SE	<i>p</i>
HMar cohort									
sAXL	0.667	0.110	0.194	0.742	0.068	0.003	0.857	0.067	0.004
GAS6	0.741	0.091	0.060	0.581	0.082	0.328	0.857	0.060	0.004
CA19-9	0.614	0.128	0.376	0.864	0.058	0.000	0.882	0.056	0.002
HClinic cohort									
sAXL	0.342	0.075	0.061	0.827	0.043	<0.0001	0.743	0.044	<0.0001
GAS6	0.357	0.086	0.09	0.770	0.064	0.001	0.713	0.045	<0.0001
CA19-9	0.823	0.091	<0.0001	0.673	0.068	0.046	0.859	0.036	<0.0001

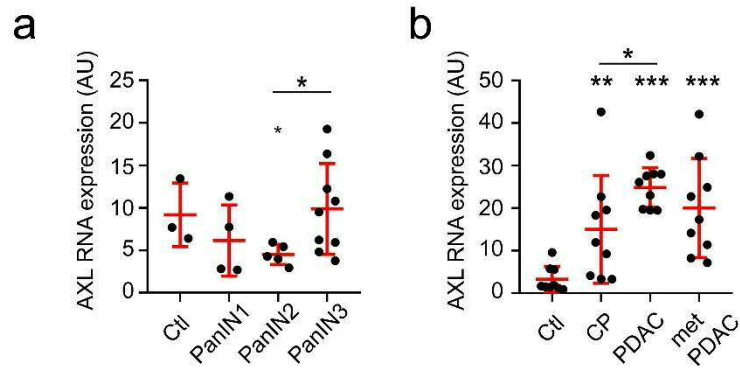
AUC, area under the curve; CP, chronic pancreatitis; Ctl, control; ns, non-significant; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; SE, standard error.

Table S8. Cut-offs, sensitivity and specificity values derived from ROC curves for individual or combined determinations of sAXL, GAS6 and CA19-9 plasma values in HMar and HClinic cohorts.

ROC	Ctl-CP			CP-PDAC			Ctl-PDAC		
	Value	SENS	SP	Value	SENS	SP	Value	SENS	SP
HMar cohort									
sAXL	51.4	47.6	85.7	66.98	41.9	100	55.6	64.5	100
GAS6	14.8	61.9	100	-	-	-	14.0	71.0	100
CA19-9	-	-	-	88.1	82.8	95.0	70.5	82.8	100
Gal-1	28.2	82.6	100	-	-	-	28.2	77.4	100
sAXL + Gal-1	51.4 28.2	85.7	100	-	-	-	55.6 28.2	90.3	100
sAXL + CA19-9	-	-	-	66.98 88.1	82.8	100	55.6 70.5	90.3	100
sAXL + Gal-1 +CA19-9	-	-	-	-	-	-	55.6 28.2 70.5	100	100
HClinic cohort									
sAXL	-	-	-	47.3	65.0	100	48.7	65.0	87.0
GAS6	-	-	-	14.4	70.0	81.3	15.0	66.3	69.6
CA19-9	15.5	84.6	82.6	279.0 77.0*	46.8 64.6	92.3 69.2	43.5	75.9	100
sAXL +GAS6	-	-	-	47.3 14.4	76.0	100	48.7 15.0	73.8	87.0
CA19-9 +sAXL	-	-	-	77.0* 47.3	89.9	100	43.5 48.7	91.3	100
CA19-9 +GAS6	-	-	-	77.0* 14.4	87.3	92.3	43.5 15.0	91.3	100

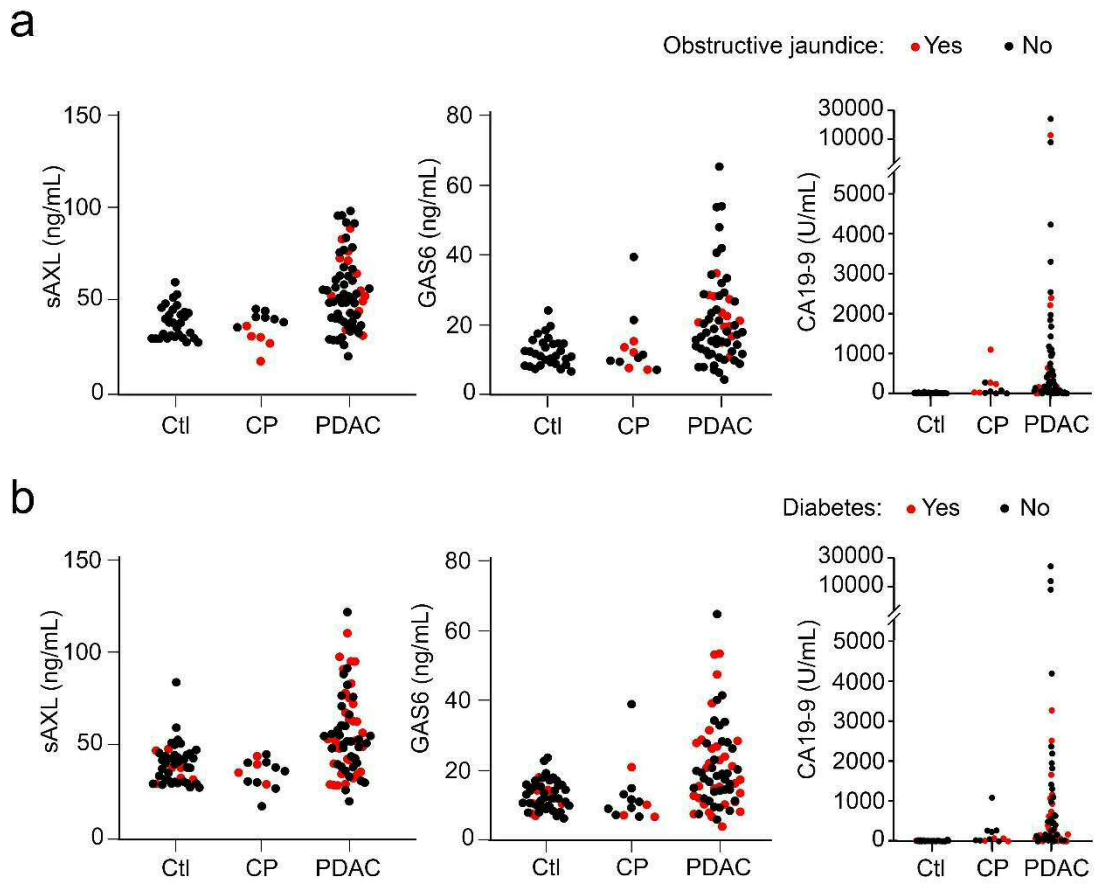
All cut-offs maximize the Youden index except otherwise indicated. CP, chronic pancreatitis; Ctl, control; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; SENS, sensitivity; SP, specificity.

* This value balances specificity and sensitivity for CA19-9 in the HClinic cohort, without maximizing Youden index.

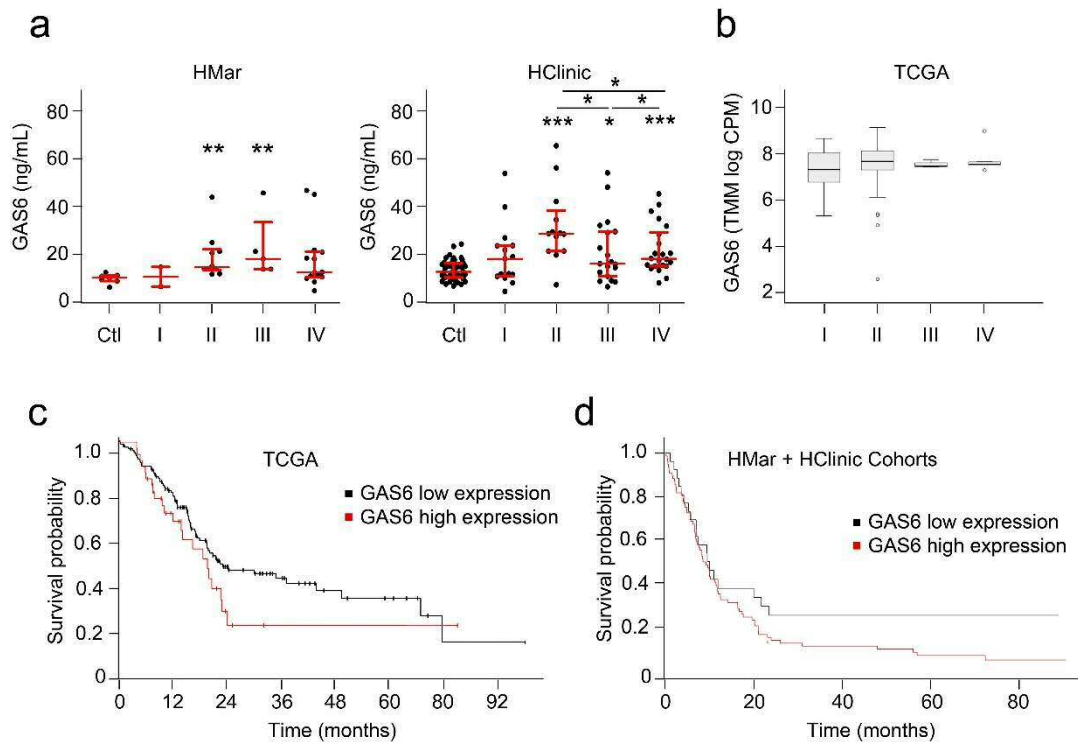


Caption 9. EBIOM-D-21-03117_Figure S1. AXL RNA analysis in previous published literature.

(a) AXL RNA expression (TPM) from normal pancreatic duct (n=3), PanIN-1 (n=4), PanIN-2 (n=5) and PanIN-3 (n=9). Tissue were laser microdissected and analyzed by RNA-sequencing as reported in Ayars M et al. Oncotarget 2017. (b) AXL RNA expression derived from the Affymetrix GeneChip Human Genome U95Av2 Array analyzing control tissue (n=9), CP (n=9), PDAC (n=9) and metastatic PDAC (n=9), derived from Abdollahi A et al. PNAS 2007.

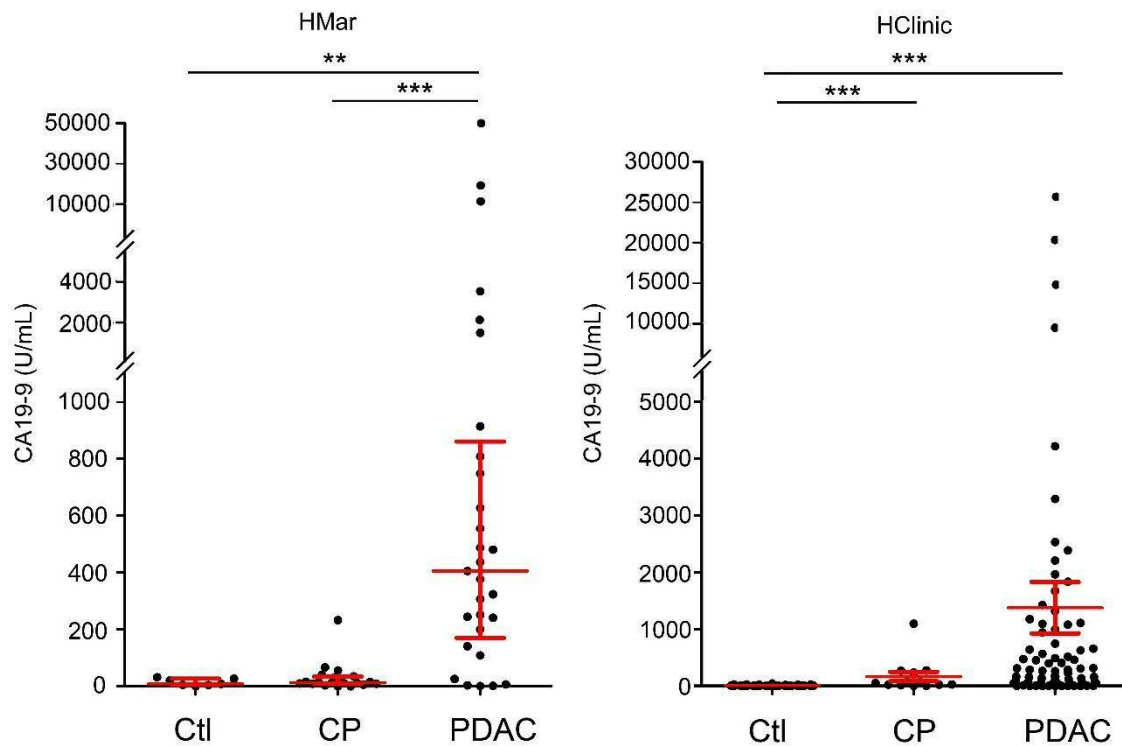


Caption 10. EBIOM-D-21-03117_Figure S2. sAXL, GAS6 and CA19-9 levels in HClinic cohort levels considering obstructive jaundice (a) and diabetes (b). Subjects with obstructive jaundice or diabetes are depicted in red.



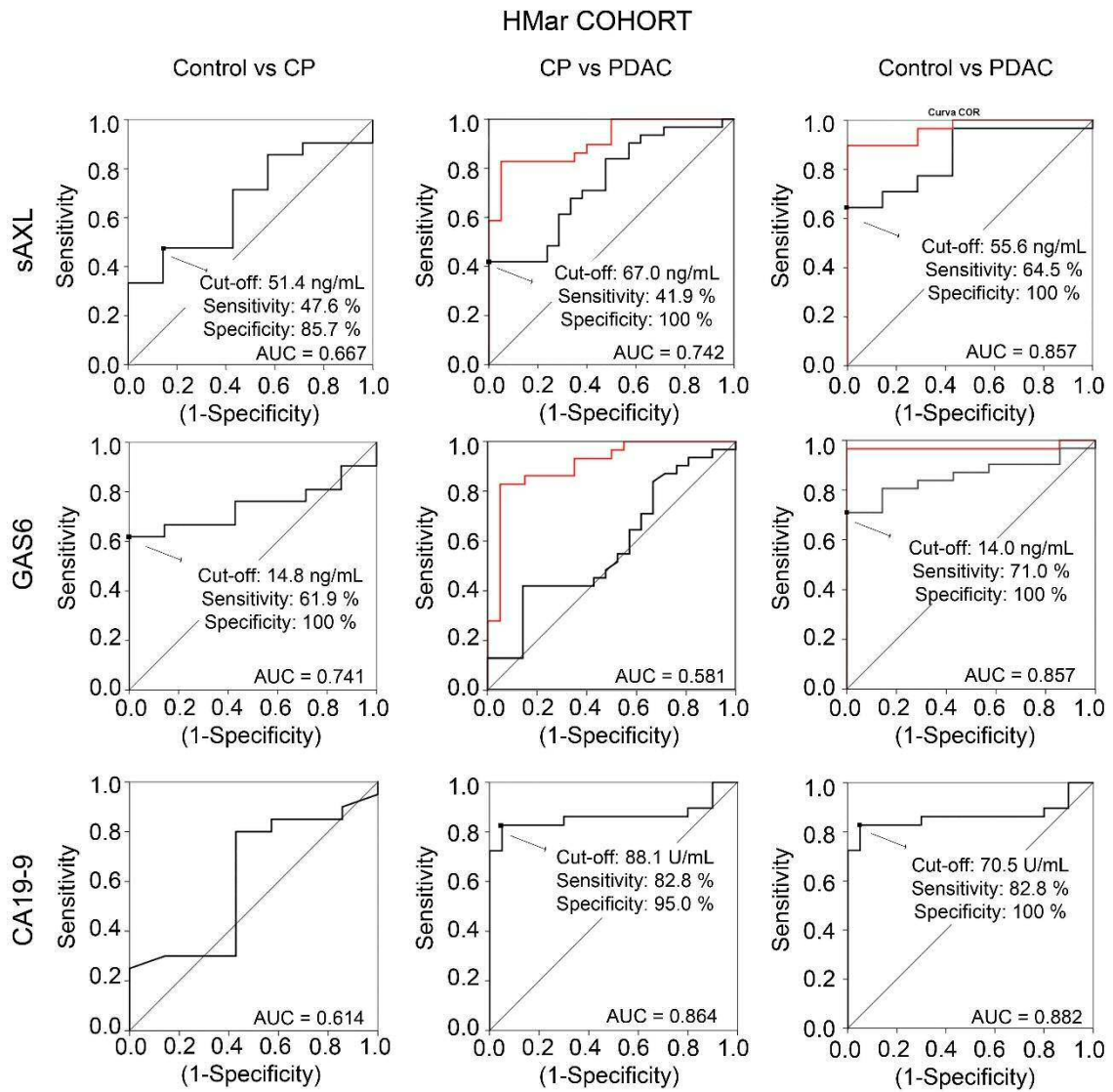
Caption 11. EBIOM-D-21-03117_Figure S3. Analysis of GAS6 plasma levels during PDAC progression and prognostic value.

(a) Left panel, determination of GAS6 plasma levels in HMar cohort's samples from controls (ctl) ($n = 7$) or PDAC patients segregated by clinical stage: I ($n = 2$), II ($n = 9$), III ($n = 4$), IV ($n = 14$). Right panel, GAS6 in HClinic cohort according to stage: ctl ($n = 46$); I ($n = 15$); II ($n = 13$); III ($n = 19$); IV ($n = 22$). Data were analyzed with Kruskal-Wallis (HMar, $p = 0.500$; HClinic, $p = 0.067$) and Mann Whitney tests, all asterisks refer to Mann Whitney comparisons with the control group unless otherwise specified * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (b) TCGA GAS6 RNA expression levels were analyzed in TCGA database in different tumor stages: I ($n = 21$), II ($n = 150$), III ($n = 3$), IV ($n = 5$). (c) In the TCGA data, a cut-off at 44.9 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) for GAS6 RNA expression was set to discriminate low ($n = 138$) or high expression groups ($n = 38$), $p = 0.12$. (d) Prognosis of patients in both HMar and HClinic cohorts according to their GAS6 plasma levels, using a cut off at 12.8 ng/mL, discriminating patients with low ($n = 27$) and high ($n = 80$) GAS6 plasma levels, $p = 0.14$ (log rank test).



Caption 12. EBIOM-D-21-03117_Figure S4. Determination of CA19-9 plasma levels in samples from two independent cohorts.

Concentration of CA19-9 in the HMar cohort (left), including healthy controls ($n = 7$), CP ($n = 20$) and PDAC ($n = 29$), and HClinic cohort (right) including healthy controls ($n = 46$), CP ($n = 13$) and PDAC ($n = 70$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann Whitney test).



Caption 13. EBIOM-D-21-03117_Figure S5. ROC analysis in the Hmar cohort.

ROC analysis to compare sAXL, GAS6 and CA19-9 biomarker performance to discriminate Ctl, CP and PDAC patients in the HMar cohort. Area under the curve (AUC), cut-off values maximizing youden index and sensitivity/specificity values are depicted in the graph. Red lines show ROC curve for sAXL or GAS6 combined with CA19-9.

3.3 Resultados. Artículo 2

Morales A, Rojo Rello S, **Cristóbal H**, Fiz-López A, Arribas E, Marí M, Tutusaus A, de la Cal-Sabater P, Nicolaes GAF, Ortiz-Pérez JT, Bernardo D, García de Frutos P. **Growth Arrest-Specific Factor 6 (GAS6) Is Increased in COVID-19 Patients and Predicts Clinical Outcome.** *Biomedicines*. 2021 Mar 26;9(4):335. doi: 10.3390/biomedicines9040335. PMID: 33810394; PMCID: PMC8065652.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) es una patología provocada por SARS-CoV-2, un virus de RNA que se esparció rápidamente desde China al resto de países, provocando una pandemia mundial. Este virus afecta al tracto respiratorio e intestinal en humanos y animales, y se caracteriza por provocar neumonía, linfocitopenia y una tormenta incontrolada de citoquinas proinflamatorias. En este estudio analizamos el sistema GAS6/AXL como marcador de pronóstico de la COVID-19 y el posible uso terapéutico de los inhibidores de este sistema.

En primer lugar, analizamos muestras de plasma obtenidas de 132 pacientes en el momento que acudieron a urgencias del Hospital Clínic de Barcelona durante la primera ola de la pandemia, del 27 al 31 de marzo de 2020. Mediante el diagnóstico de PCR para SARS-CoV-2, 52 pacientes dieron negativo y 80 positivo. Del grupo con PCR positiva, 8 pacientes no necesitaron hospitalización, mientras que de los 72 restantes sí que fueron hospitalizados, de los cuales 56 pacientes sobrevivieron y 16 fallecieron.

Mediante la técnica de ELISA, medimos las concentraciones de sAXL, sMERTK y GAS6 en plasma de estos 132 pacientes. Como resultados de GAS6, obtuvimos que el grupo con PCR negativa fue el que tuvo los valores más bajos, comparado con los que dieron positivo. Dentro del grupo con COVID-19, vimos que los valores más altos correspondían a los que necesitaron hospitalización, siendo aún más elevados en el grupo que no sobrevivió. En más detalle, encontramos que los niveles de GAS6 aumentaban progresivamente según la severidad de la enfermedad, por lo que asociamos la concentración de GAS6 en plasma como una herramienta para predecir el desarrollo y final de la enfermedad.

Por lo que refiere a la medición de sAXL en plasma, obtuvimos que sAXL estaba significativamente aumentado en los pacientes que fallecieron, comparado con los pacientes con PCR negativa y aquellos que sí fueron hospitalizados pero que sobrevivieron.

Finalmente, no encontramos diferencias significativas en la medición de sMERTK en plasma. No obstante, los valores estaban ligeramente aumentados en el grupo de pacientes que falleció, respecto a los individuos negativos en PCR y los que sobrevivieron a la infección.

Como conclusión de este primer apartado del estudio, sugerimos que GAS6 actúa en las fases iniciales de la infección, actuando como un mecanismo de respuesta al virus. También, consideramos que AXL podría ser un posible receptor de entrada del virus a la célula huésped.

En segundo lugar, para confirmar que AXL, MERTK Y GAS6 se expresan específicamente en células del tracto respiratorio, analizamos su expresión a nivel de ARNm usando la base de datos pública *Protein Atlas*. Como resultados, vimos que GAS6 se expresa en células alveolares (tipo 1 y 2) y en células endoteliales, AXL en macrófagos alveolares y del tracto respiratorio y MERTK en células alveolares de tipo 2 y macrófagos.

Por último, tratamos las células THP-1 con Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) para su diferenciación de monocitos a macrófagos. Seguidamente, las tratamos con lipopolisacárido (LPS) para la inducción de genes proinflamatorios: IL-1 β , TNF y CCL2/MCP-1. Paralelamente, tratamos las células con bemcentinib (un inhibidor específico de AXL), con GAS6 y con un anticuerpo activador antiAXL, en presencia y ausencia de LPS. Como resultados, la inhibición con bemcentinib resultó en una disminución de la expresión de citoquinas tanto en presencia como ausencia de LPS, especialmente en la de CCL2/MCP-1. El tratamiento con solo GAS6 no aumentó la expresión de estos genes proinflamatorios, pero con el anticuerpo antiAXL sí que aumentaron ligeramente después del tratamiento con LPS.

Con los resultados de este estudio, concluimos que la concentración de GAS6 en plasma podría ser un indicador proporcional a la severidad de la infección vírica, es decir, sería un marcador de pronóstico del paciente. Además, la inhibición del sistema GAS6/AXL con bemcentinib reduce la producción de citoquinas proinflamatorias después del tratamiento con LPS en células THP-1. Todo esto sugiere que el sistema GAS6/AXL tiene un rol importante en la respuesta inmunitaria frente a la COVID-19.



Communication

Growth Arrest-Specific Factor 6 (GAS6) Is Increased in COVID-19 Patients and Predicts Clinical Outcome

Albert Morales ^{1,2}, Silvia Rojo Rello ³, Helena Cristóbal ¹, Aida Fiz-López ⁴, Elisa Arribas ⁴, Montserrat Mari ¹, Anna Tutusaus ¹, Paloma de la Cal-Sabater ⁴, Gerry A.F. Nicolaes ⁵, José T. Ortiz-Pérez ⁶, David Bernardo ^{4,7} and Pablo García de Frutos ^{1,8,9,*}

- ¹ Department of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain; amorales@clinic.cat (A.M.); helena.cristobal@iibb.csic.es (H.C.); monmari@clinic.cat (M.M.); anna.tutusaus@iibb.csic.es (A.T.)
- ² Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group, Liver Unit, Hospital Clínic, CIBEREHD, 08036 Barcelona, Spain
- ³ Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, 47003 Valladolid, Spain; 12393921A@saludcastillayleon.es
- ⁴ Mucosal Immunology Lab, Unidad de Excelencia Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM), Universidad de Valladolid—CSIC, 47003 Valladolid, Spain; aidafizlopez@gmail.com (A.F.-L.); elisarribas@usal.es (E.A.); calsabater89@gmail.com (P.d.l.C.-S.); David.bernardo@uva.es (D.B.)
- ⁵ Department of Biochemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), Maastricht University, 6200 MD Maastricht, The Netherlands; g.nicolaes@maastrichtuniversity.nl
- ⁶ Clinic Cardiovascular Institute, Hospital Clínic Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; jtortiz@clinic.cat
- ⁷ Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 28029 Madrid, Spain
- ⁸ Centro de Investigación Biomédica en Red Sobre Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), 28029 Madrid, Spain
- ⁹ Department of Cell Death and Differentiation, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IIBB-CSIC, Rosselló 161, 6th Floor, 08036 Barcelona, Spain
- * Correspondence: Pablo.garcia@iibb.csic.es



Citation: Morales, A.; Rojo Rello, S.; Cristóbal, H.; Fiz-López, A.; Arribas, E.; Mari, M.; Tutusaus, A.; de la Cal-Sabater, P.; Nicolaes, G.A.F.; Ortiz-Pérez, J.T.; et al. Growth Arrest-Specific Factor 6 (GAS6) Is Increased in COVID-19 Patients and Predicts Clinical Outcome. *Biomedicines* **2021**, *9*, 335. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040335>

Academic Editor: Janka Petravić

Received: 12 March 2021
Accepted: 23 March 2021
Published: 26 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Growth arrest-specific factor 6 (GAS6) and the Tyro3, AXL, and MERTK (TAM) receptors counterbalance pro-inflammatory responses. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2, particularly in the respiratory system, and the GAS6/AXL axis is targeted in current clinical trials against COVID-19. However, GAS6 and TAMs have not been evaluated in COVID-19 patients at emergency admission. Methods: Plasma GAS6, AXL, and MERTK were analyzed in 132 patients consecutively admitted to the emergency ward during the first peak of COVID-19. Results: GAS6 levels were higher in the SARS-CoV-2-positive patients, increasing progressively with the severity of the disease. Patients with initial GAS6 at the highest quartile had the worst outcome, with a 3-month survival of 65%, compared to a 90% survival for the rest. Soluble AXL exhibited higher plasma concentration in deceased patients, without significant differences in MERTK among SARS-CoV-2-positive groups. GAS6 mRNA was mainly expressed in alveolar cells and AXL in airway macrophages. Remarkably, THP-1 human macrophage differentiation neatly induces AXL, and its inhibition (bemcentinib) reduced cytokine production in human macrophages after LPS challenge. Conclusions: Plasma GAS6 and AXL levels reflect COVID-19 severity and could be early markers of disease prognosis, supporting a relevant role of the GAS6/AXL system in the immune response in COVID-19.

Keywords: COVID-19; AXL; MERTK; GAS6; viral infection; immune response; immunothrombosis; vitamin K

1. Introduction

COVID-19 is characterized by the induction of an uncontrolled release of cytokines [1]. This is an important aspect of the disease as systemic immune overactivation due to SARS-CoV-2 infection causes the cytokine storm which can become life-threatening for

the patient [2,3]. The body possesses restorative mechanisms, early triggered by pathogen and damage-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs), to counterbalance this pro-inflammatory response. One such protection system consists of vitamin K-dependent plasma proteins, which require carboxylation to become biologically active, and that serve as ligands for tyrosine kinase receptors of the Tyro3, AXL, and MERTK (TAM) subfamily [4,5]. The system consists of two soluble ligands, protein S (PROS1) and growth arrest-specific factor 6 (GAS6), and three membrane protein kinase receptors, (Tyro3, AXL, and MERTK). Components of the GAS6/TAM system increase in a diverse spectrum of inflammatory conditions [6], including septicemia and septic shock; but also in systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in the absence of infection [7].

In several studies, plasma GAS6 concentration upon admission to intensive care is correlated with the severity of organ damage and acute respiratory distress syndrome [8–11]. Furthermore, recent data describe an interaction of the AXL receptor with the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [12]. This is particularly important, as ACE2 receptor expression is extremely low in the lower respiratory system, where AXL could have a prominent role. AXL inhibition is in clinical trial for COVID-19 treatment (ACCORD-2-001). Despite these facts, to date, no data have been reported on plasma concentrations of GAS6 and TAM receptors at the time of hospital admission of patients with COVID-19.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

We prospectively measured the concentration of GAS6, sAXL and sMERTK in 132 consecutive patients admitted to the emergency ward of “Hospital Clínico Universitario de Valladolid” (Valladolid, Spain). The study was approved by the CEIm of the “Area de Salud Valladolid Este” PI20-1716, with the required signed informed consent. COVID-19 diagnosis was established by PCR for SARS-CoV-2 in airway secretion performed at admission. Individual demographic and clinical data from each group are included as Supplemental Data.

2.2. Cell Culture and Treatments

THP-1 human monocytic cells (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were activated to macrophages with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). In brief, THP-1 cells were counted and seeded in 12-well plates (250.000 cells/well) in the presence of 100 ng/mL PMA for 4 days (in RPMI + 10% FBS). Afterwards, the PMA-containing media were removed; cells were washed and left overnight with RPMI + 2.5% FBS + 50 µM beta-mercaptoethanol. Then, THP-1 macrophages were pre-incubated with bemcentinib (1 µg/mL, BerGenBio AS, Bergen, Norway) for 60 min before adding LPS (50 ng/mL; E. coli 0111:B4 Sigma-Aldrich) for inflammatory activation for 2 hrs. Additionally, THP-1 cells were incubated with recombinant human GAS6 (500 ng/mL; 885-GS R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or activating goat antihuman AXL polyclonal antibody (10 nM; R&D AF154). Afterwards, total RNA was isolated with TRIzol reagent, reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer’s instructions. The housekeeping gene 18S was used as reference gene for normalization. To analyze THP-1 inflammatory features, the mRNA expression of IL-1beta, MCP1, TNF, and IL-6 were determined.

The primers sequences used were:

MCP1 (NM_002982):

5'-CCCCAGTCACCTGCTGTTAT-3', 5'-TGGAATCCTGAACCCACTTC-3'

IL-1beta (NM_000576):

5'-TCAGCCAATCTTCATTGCTC-3', 5'-GCCATCAGCTTCAAAGAACA-3'

TNF-alpha (NM_000594):

5'-TTTGATCCCTGACATCTGGA-3', 5'-GGCCTAAGGTCCTTGTGT-3'

18S (NM_022551):

5'-TCACTGAGGATGAGGTGGAA-3', 5'-GCTTGTGTCCAGACCATTG-3'
 IL-6 (NM_00600):
 5'-GACAGCCACTCACCTCTTCA-3', 5'-CCTCTTTGCTGCTTTCACAC-3'

2.3. Quantitation of MERTK, AXL, and GAS6 in Plasma

Soluble MERTK (sMERTK), soluble AXL (sAXL), and GAS6 levels were determined in plasma from patients by the ELISA technique using commercial kits from R&D systems (DuoSet ELISA, McKinley, MN, USA) following the manufacturer's instructions. Plasma samples were diluted 1:50 before determination (GAS6, sAXL) or 1:10 (sMERTK). These DuoSet ELISA kits, with the components required for the development of sandwich ELISAs, allow one to measure natural and recombinant human GAS6, sAXL and sMERTK proteins in cell culture supernatants, serum, plasma, or urine samples at physiopathological concentrations (kits reference and detection range: DY885B GAS6, 15.6–000 pg/mL; DY154 sAXL, 62.5–4000 pg/mL; DY6488 sMERTK, 78.1–5000 pg/mL).

2.4. Immunoblot Analysis

Cell lysates were prepared in RIPA buffer plus proteinase inhibitors. Samples containing 25 µg were separated by 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, blocked in 5% nonfat milk for 1 h at room temperature, and incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies: AXL (M20, sc-1097, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) 1:250 goat; β-actin-HRP (A3854, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:40,000 mouse.

2.5. mRNA Expressions of GAS6, AXL, and MERTK in Human Lung

Diagrams were graphed based on single-cell data from the Human Protein Atlas accessed on 18 January 2021 [13]:

GAS6: www.proteinatlas.org/ENSG00000183087-GAS6/celltype/lung, accessed on 18 January 2021.

AXL: www.proteinatlas.org/ENSG00000167601-AXL/celltype/lung, accessed on 18 January 2021.

MERTK: www.proteinatlas.org/ENSG00000153208-MERTK/celltype/lung, accessed on 18 January 2021.

2.6. Statistical Analysis

GraphPad Prism Software (version 4.02, La Jolla, CA, USA) was used to perform a one-way Anova analysis with Bonferroni's multiple comparison as post-hoc test. Significance levels were defined as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$. In addition, survival data were graphed using Kaplan–Meier estimate and Logrank test for comparison among curves.

3. Results and Discussion

Increased circulating levels of GAS6 are detected after organ damage and several inflammatory settings. To evaluate its possible participation in COVID-19 we measured GAS6 in plasma samples from patients admitted consecutively to the emergency services of a single university hospital in Valladolid (Spain) during the first peak of the COVID-19 pandemic (from 27 to 31 March 2020). The population consisted entirely of local residents with a median age of 65 years (IQR; 54–77) and 51% female (Supplementary Table S1). Fifty-two patients tested negative for SARS-CoV-2 (NEG), while 80 were positive for the virus. The diagnosis was established by SARS-CoV-2 PCR in airway secretion. Individual data for each group are included in Supplemental Data.

The concentration of GAS6 in plasma was significantly higher in the SARS-CoV-2-positive group (19.3 ± 1.0 ng/mL vs. 11.6 ± 1.0 ng/mL; $p < 0.001$) than in negative patients.

Next, we stratified SARS-CoV-2-positive patients based on their different outcomes. A group of patients did not require admission at the hospital (OUT; $n = 8$), while the rest required hospitalization ($n = 72$). Of the latter group, 56 patients survived up to 3 months

of observation from hospital admission (IN), while 16 patients died (EX). When the values of GAS6 at admission were compared (Figure 1A), those patients who did not require hospitalization showed the lowest values (OUT, 13.0 ± 1.0 ng/mL), similar to the levels observed in SARS-CoV-2-negative patients.

However, individuals that needed hospitalization and survived (IN; 18.3 ± 1.2 ng/mL; $p = 0.043$) and those who died (EX, 25.7 ± 2.4 ng/mL; $p = 0.004$) exhibited significantly higher plasma GAS6 concentrations than those of SARS-CoV-2-negative patients. Therefore, the amount of GAS6 in the plasma increased progressively with the severity of the disease in SARS-CoV-2-positive patients, increased GAS6 levels also being associated with the need for clinical admission. We then tested if the concentration of GAS6 at the initial admission could be predictive of the final outcome of the illness. We divided the group in quartiles according to their GAS6 values and compared the survival curves using a Cox regression analysis. The survival pattern is reflected in the Kaplan–Meier plot shown in Figure 1B.

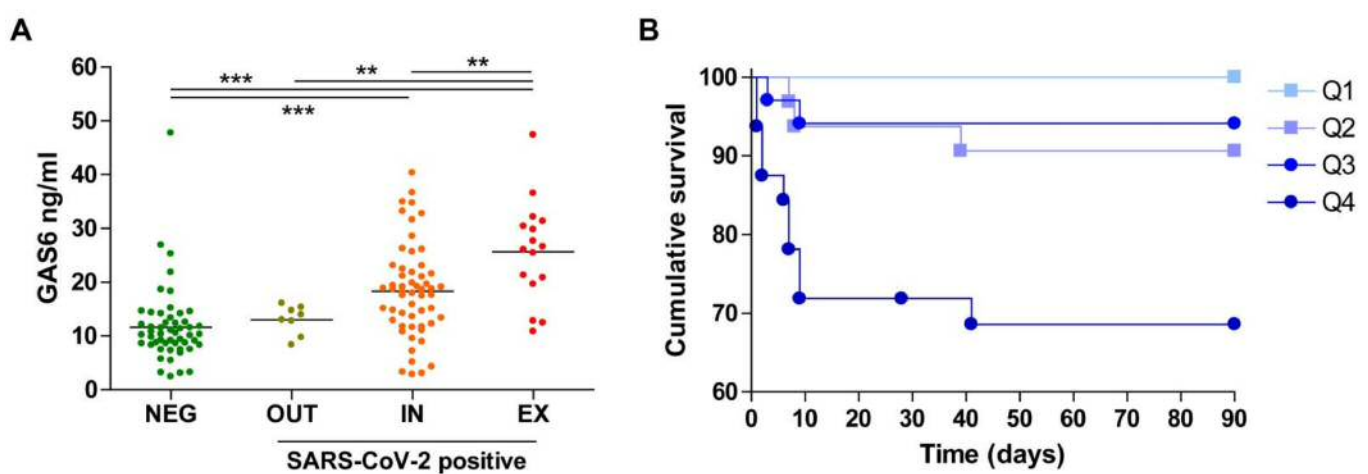


Figure 1. Plasma growth arrest-specific factor 6 (GAS6) concentration in consecutive emergency patients and survival curves related to quartile GAS6 values. (A) GAS6 plasma concentration was measured in patients (NEG, negative test for SARS-CoV-2; OUT, positive test not requiring hospital admission; IN, positive test and admission survivors; EX, positive test, deceased) and compared using one-way Anova. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (B) Survival plot of all patients divided by GAS6 concentration quartile at admission. Lowest quartile (Q1), second quartile (Q2), third quartile (Q3), and highest quartile (Q4). The GAS6 survival curves were different in a logrank test ($p < 0.0001$) and the Q4 survival was significantly different to all other curves ($p = 0.004$ vs. Q3; $p = 0.017$ vs. Q2 and $p < 0.001$ vs. Q1).

Those patients with the highest quartile of GAS6 concentration at the moment of admission had the worst outcome with a survival of 65% at 3 months, significantly different from the other groups that showed a survival of over 90%. Of note, in the lowest GAS6 quartile, all SARS-CoV-2-positive patients survived.

We also measured sAXL and sMERTK, the products of the proteolytic shedding of the main receptors for GAS6 found in plasma. For sAXL, only the group of SARS-CoV-2-positive patients that did not survive during the initial 90 days (EX) had a significantly higher concentration in plasma compared to the SARS-CoV-2-negative and surviving positive groups (Figure 2A). Nevertheless, patients admitted to the emergency ward with higher sAXL values in plasma showed worse survival than those with lower concentration, although this association was not as strong as that observed for the GAS6 highest quartile (Figure 2B).

In contrast, no significant differences were observed in sMERTK concentration among the COVID-19-positive groups (Figure 3A), although the group of SARS-CoV-2-positive patients that died during the initial 90 days (EX) displayed higher sMERTK levels than the SARS-CoV-2-negative group. In addition, a trend for worst outcome was also observed in the patients with higher sMERTK levels (Figure 3B).

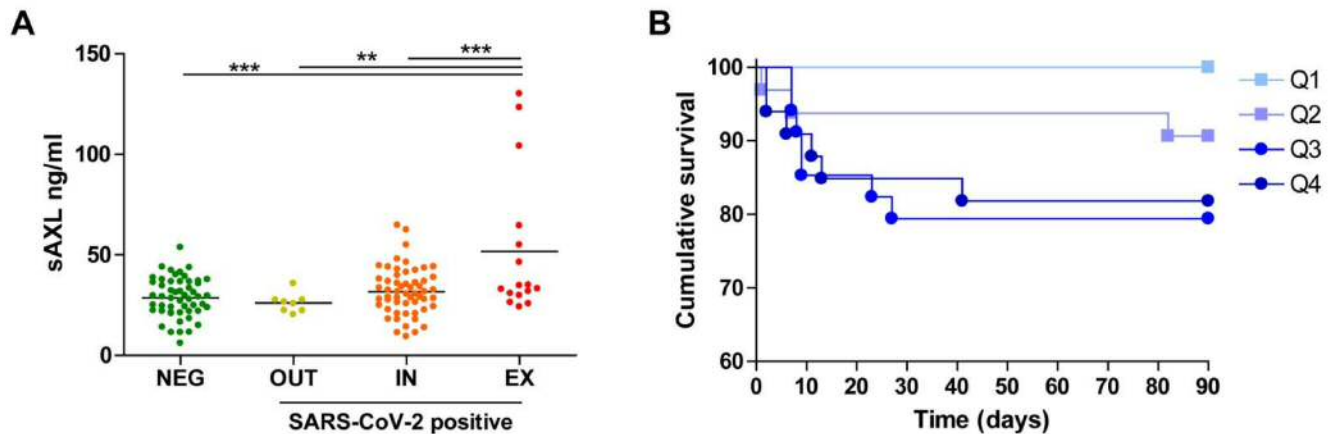


Figure 2. Plasma soluble AXL (sAXL) concentration in consecutive emergency patients and survival curves related to quartile AXL values. (A) sAXL plasma concentration was measured in all patients and compared using one-way Anova. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (B) Survival plot of all patients divided by sAXL quartile at admission. The sAXL survival curves were different in a logrank test ($p < 0.048$) and the Q4 survival was significantly different only to the Q1 curve ($p = 0.011$).

Considering that the samples were obtained at admission to the emergency ward, our results suggest that GAS6 is expressed as an early mechanism of response to the viral infection by SARS-CoV-2 and points to AXL as a possible receptor involved in COVID-19-related GAS6 signaling.

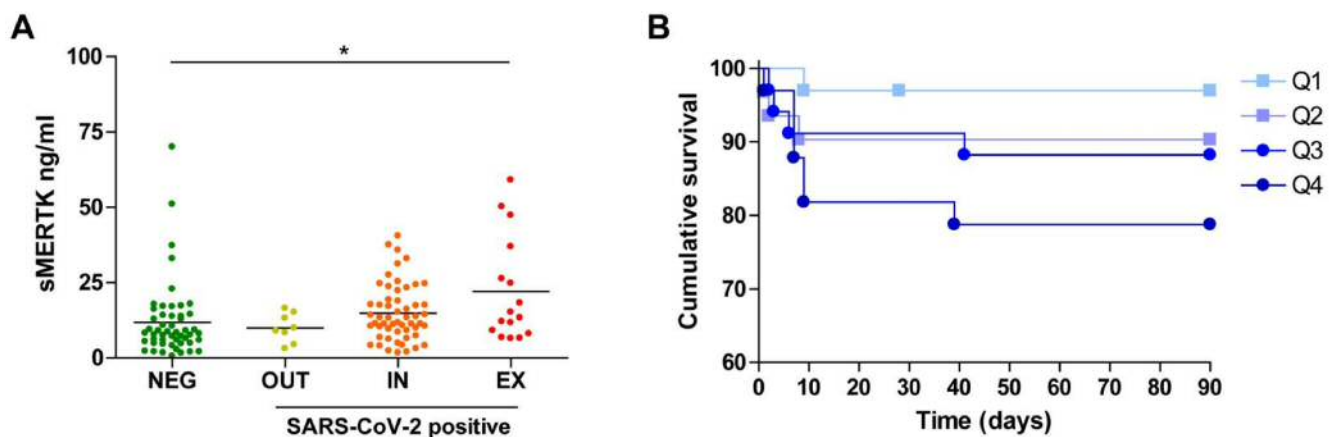


Figure 3. Plasma soluble MERTK (sMERTK) concentration in consecutive emergency patients and survival curves related to quartile MERTK values. (A) sMERTK plasma concentration was measured in all patients and compared using one-way Anova. *, $p < 0.05$. (B) Survival plot of all patients divided by sMERTK concentration quartile at admission. The MERTK survival curves were not different in a logrank test ($p = 0.154$) and the Q4 survival was significantly different only to the Q1 curve ($p = 0.024$ vs. Q1).

To confirm the specific expression of these molecules on different cell types of the respiratory tract that may have a relevant role in COVID-19 development, we analyzed GAS6, AXL, and MERTK mRNA expression in a public database for single-cell RNAseq experiments [13]. As shown in Figure 4, GAS6 is mainly expressed in alveolar cells (type I and type II) and endothelial cells.

Interestingly, AXL mRNA is noticeably more expressed in the macrophage cluster including airway/alveolar macrophages, in line with data on record [14], and to a lesser extent in fibroblasts. The high AXL expression in airway/alveolar macrophages suggests that this cell type is where AXL may play a more relevant role.

To verify this point, we treated PMA-activated human THP-1 cells with LPS and quantified cytokine production. As expected, activated THP-1 cells exposed to LPS exhibited an induction of inflammatory genes such as IL-1b, TNF or MCP-1 (Figure 5).

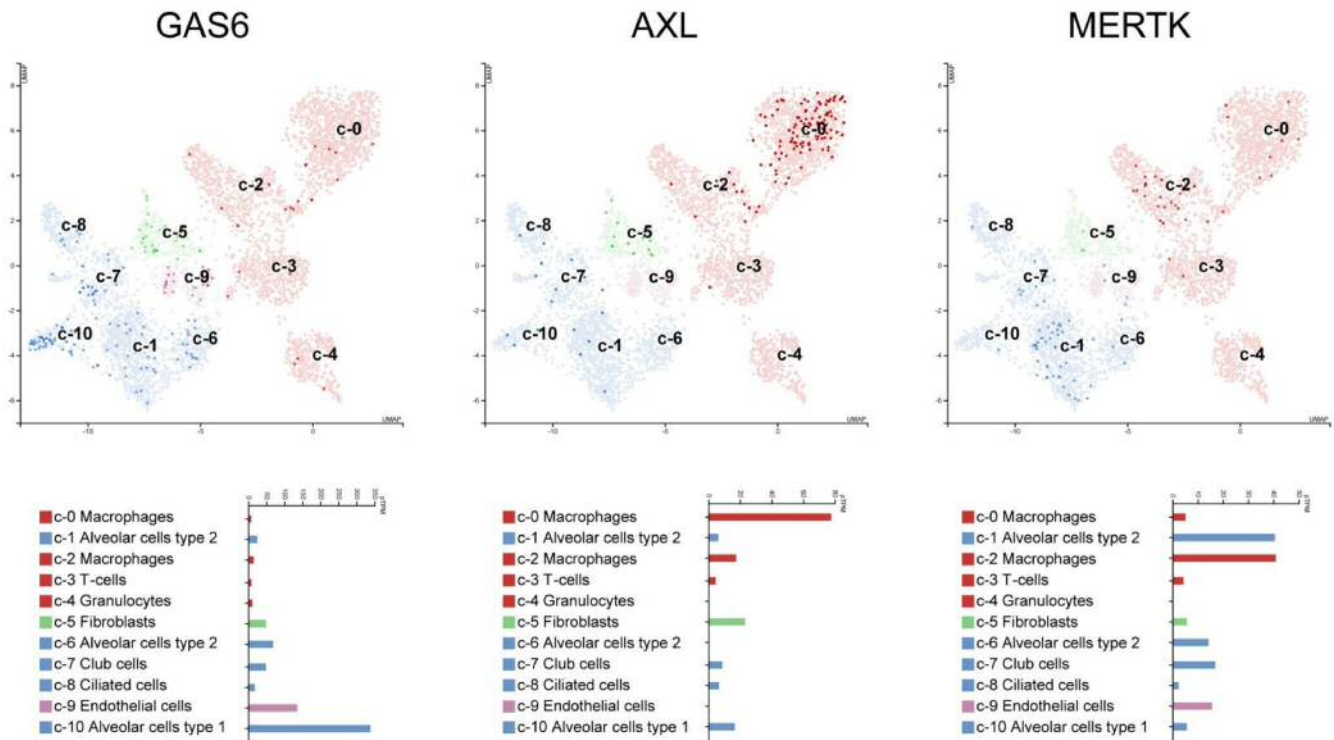


Figure 4. GAS6, AXL, and MERTK mRNA expression in human lung cells. Individual cells in each cluster are visualized with color intensity according to the specific mRNA expression; where each dot corresponds to a cell. Mean mRNA expression on each individual cell type is indicated below. Data are derived from <http://www.proteinatlas.org>.

Specific AXL inhibition with bemcentinib was enough to diminish cytokine expression upon LPS exposure, particularly decreasing MCP-1 levels significantly. Interestingly, MCP-1 has also been proposed as a biomarker associated with disease severity of COVID-19 [15], suggesting that MCP-1 reduction obtained after AXL inhibition may be involved in less recruitment of monocytes and thrombosis protection.

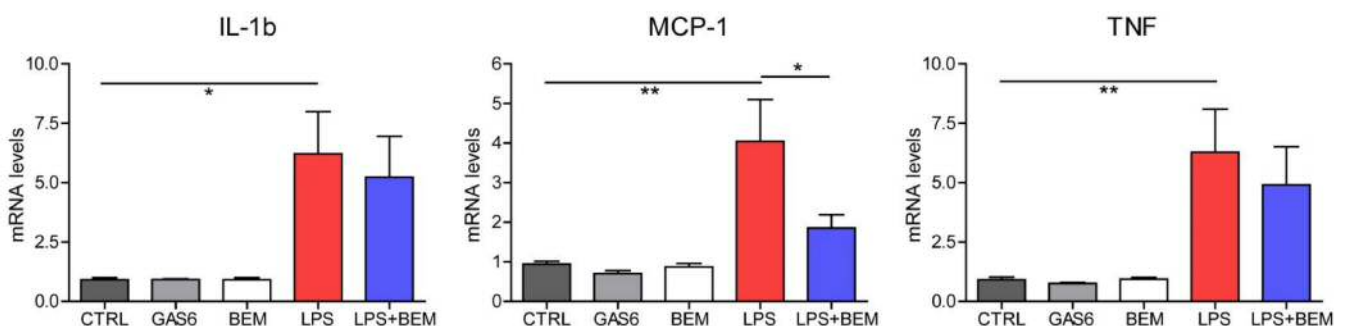


Figure 5. AXL inhibition reduced cytokine production upon LPS challenge in activated human macrophages (THP-1 cells). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated THP-1 cells were exposed to LPS (50 ng/mL) and/or pre-incubated for 1 h with bemcentinib (1 µg/mL). mRNA levels of IL-1β, MCP-1, and TNF were determined 2 h later. A control group was stimulated with recombinant human 500 ng/mL GAS6. Groups were compared using one-way Anova. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Of note, GAS6 alone did not increase cytokine production, indicating that blockade of the GAS6/AXL axis is only required when the pro-inflammatory process has been triggered.

Moreover, incubation of activated THP-1 cells with an anti-AXL activating antibody was only modestly effective to further increase cytokine induction by LPS (Figure 6A). Although IL-1b or IL-6 upregulation was detected after 6 h of LPS challenge, this was not significantly observed for MCP-1 or TNF. In this sense, the strong expression of AXL after PMA activation exhibited by THP-1 cells (Figure 6B) may justify the discreet effect of additional AXL activation by addition of GAS6 or AXL-activating antibodies.

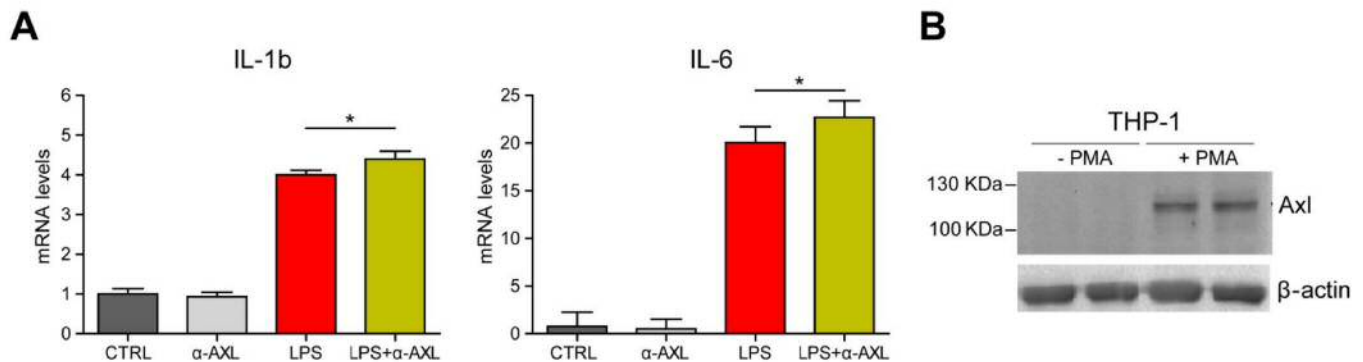


Figure 6. AXL overexpression in activated human macrophages (THP-1 cells) and effect of AXL-activating antibodies on LPS-induced cytokine production. (A) PMA-activated THP-1 cells were exposed to LPS (50 ng/mL) and/or pre-incubated for 1 h with an activating goat antihuman AXL polyclonal antibody (10 nM; R&D AF154). mRNA levels of IL-1b and IL-6 were determined 6 h later. Groups were compared using one-way Anova. *, $p < 0.05$. (B) AXL and β -actin protein expression in resting and PMA-activated THP-1 cells was analyzed.

High AXL levels could be by themselves responsible for AXL autophosphorylation, as previously reported [16], or activated by endogenous GAS6 produced by THP-1 cells, making GAS6 exogenous addition less relevant in this context. Further experiments, including those with macrophages deficient in GAS6 and TAM receptors, will be necessary to corroborate this point, being out of the scope of our communication, which is principally devoted to pinpointing for the first time the relevant alteration of the GAS6/TAM system observed in COVID-19 patients.

In other viral respiratory infections, GAS6 induction appears early after infection in animal models and its plasma concentration is maintained above the pre-infection concentration for weeks [17]. In this setting, as well as in many other models of inflammation/infection studied, GAS6/AXL represents a mechanism of control of the immune response in order to protect against organ damage resulting from the cytokine storm induced by intense inflammatory conditions.

Ni et al. have shown that recombinant GAS6 infusion improves the outcome of septicemia in mice, controlling multi-organ dysfunction [18]. One of the target cells of GAS6 in this context is the vascular endothelium that exhibits reduced LPS-induced permeability in the presence of increased GAS6 concentrations. Interestingly, GAS6 is also necessary to maintain the response of vascular endothelium during inflammatory conditions, allowing endothelial cell interactions with platelets and leukocytes [19].

Moreover, as a consequence of the increase in GAS6 activity after viral infections downregulating the local inflammatory response, the host becomes susceptible to secondary bacterial infections [17]. Therefore, the increases in GAS6 and soluble TAM receptors not only may be indicative of COVID-19-associated risk but also a signal pointing to the GAS6/TAM system as a potential target for COVID-19 treatment. Interestingly, among the underlying medical conditions linked to severe COVID-19, there are several pathologies that frequently display increased GAS6/TAMs levels, such as liver cirrhosis [20], non-alcoholic steatohepatitis [21], and chronic kidney [22], pulmonary [23], or heart diseases [24].

Whether GAS6 or other TAM changes may be particularly detrimental in these specific COVID-19 patients is another aspect that merits pursuing.

The increase observed in GAS6 underlines the importance of the vitamin K status in COVID-19. Interestingly, increased uncarboxylated matrix Gla protein has been detected in COVID-19 patients with poor outcomes [25], and regular use of oral antivitamin K anticoagulants prior to COVID-19 is associated with lower survival in elderly patients [26]. A poor vitamin K status could decrease the vitamin K-dependent actions of GAS6 and the anticoagulant PROS1, among other effects [27].

Of note, a recent publication has just observed a direct interaction of AXL with the N-terminal domain of SARS-CoV-2 spike glycoprotein [12], further increasing interest in the effect that the GAS6/AXL pathway may have on COVID-19 pathology. Interestingly, bemcentinib, which selectively inhibits AXL kinase, blocks viral entry and enhances the antiviral type I IFN response [27]. Bemcentinib, which has been reported effective in pre-clinical models against several enveloped viruses, including Ebola [28] and Zika virus [29], is now being evaluated in two Phase 2 studies for the treatment of COVID-19 in hospitalized patients (the UK national platform study-ACCORD2-EudraCT 2020-001736-95, UK; and the BerGenBio ASA study BGBC020 (CTRI-2020-10-028602), in India and South Africa).

Supporting an antiviral effect, a recent oral presentation from Dr. Maury Lab at the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI, 6–10 March 2021) has revealed that AXL facilitates ACE-2-mediated endocytosis of SARS-COV-2, which was prevented by bemcentinib in vitro [30]. In addition, in a murine hepatitis beta-coronavirus model, AXL inhibition reduced the viral load and significantly enhanced signatures of type I interferon response. These observations further justify the biomedical importance of GAS6/AXL intervention on COVID-19 treatment and highlight the relevance of GAS6/TAM serum data in COVID-19 patients for their potential role in clinical management.

In this sense, our results endorse the hypothesis that the concentration of GAS6 in the blood is proportional to the severity of the disease and could be an early marker of disease prognosis in COVID-19. In addition, levels of sAXL and sMERTK are significantly increased in deceased SARS-CoV-2-positive patients, suggesting that their measurement may provide evidence of a bad prognosis (Figure 7).

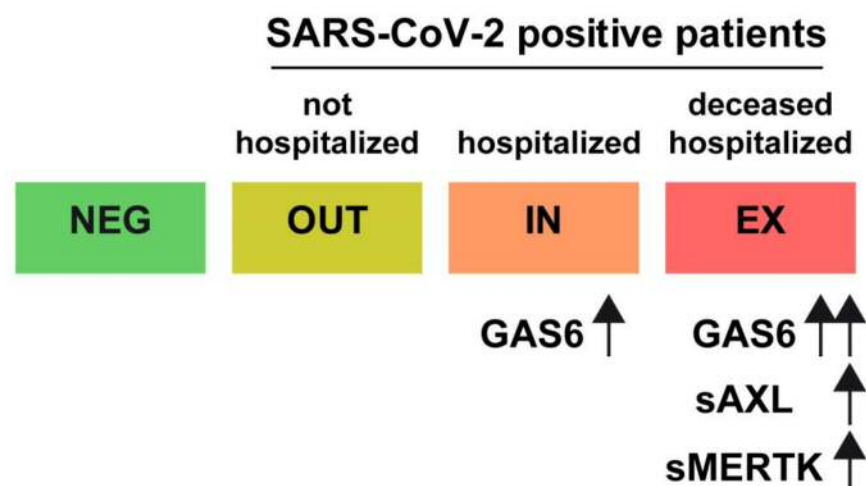


Figure 7. Schematic representation of early GAS6/AXL/MERTK changes in COVID-19 patients. Negative SARS-COV-2 patients and positive that did not require hospitalization exhibited no significant changes in GAS6-related proteins. Significant increase in GAS6 was observed in hospitalized patients, which were greater in deceased. Hospitalized patients that finally died also exhibited higher plasma concentration of sAXL and sMERTK.

Moreover, we observed that the expression of the GAS6/AXL pathway in the lung suggests that GAS6 may be secreted and play a protective role in alveolar and endothelial cells, while AXL is principally expressed in macrophages. In fact, reduction of AXL levels diminishes the production of inflammatory cytokines by macrophages upon LPS challenge. Therefore, we conclude that SARS-CoV-2 induces an immune response in which the GAS6–TAM system of ligands and receptors is implicated. Further studies are required to identify specific individuals, mainly with previous chronic pathologies, that could be particularly at risk.

4. Conclusions

GAS6 serum levels in patients admitted to the emergency ward were higher in SARS-CoV-2-positive patients, increasing progressively with the severity of the disease. In addition, deceased COVID-19 patients also exhibited higher plasma concentration of sAXL and sMERTK at the time of emergency entry. Moreover, AXL inhibition reduced cytokine production upon LPS challenge in THP-1 human macrophages, which exhibited AXL overexpression upon activation. In summary, these results support a relevant role of the GAS6/AXL system in the immune response against COVID-19, suggesting them as early markers of disease prognosis and GAS6/AXL targeting as plausible clinical therapy for COVID-19 patients.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines9040335/s1>. Supplementary Table S1: Demographic and baseline characteristics of 132 patients on admission to the Emergency Ward. Supplementary Data S1: De-identified patient data including GAS6, sAXL, and sMERTK individual values.

Author Contributions: P.G.d.F., G.A.F.N., J.T.O.-P., A.M. and D.B. designed the experiments and analyzed the data; P.G.d.F., M.M., A.T. and H.C. performed the experiments; P.G.d.F. and A.M. wrote the manuscript; D.B., S.R.R., A.F.-L., E.A. and P.d.I.C.-S. provided patient samples, data, and comments on the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN (Project# RTI2018-095672-B-I00), Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (grant numbers PI15/00531, PI19/01410), Fundació La Marató TV3 (grant numbers 20153030 and 20153031), and was co-funded by EUROPEAN UNION (ERDF “A way to make Europe”), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC-COV19-016/202020E155), Proyectos COVID-19 de la Junta de Castilla y León (07.04.467B04.74011.0), AGAUR (2017_SGR_177), and CERCA Programme/Generalitat de Catalunya.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the “Area de Salud Valladolid Este”, identification code PI20-1716, approved 24/03/2020.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Individual de-identified patient data are included in the document Supplemental data 1.

Acknowledgments: Authors are grateful to BerGenBio AS (Norway) for the gift of AXL inhibitor bemcentinib (BGB324).

Conflicts of Interest: A.M., M.M., and P.G.F. received research funding from BerGenBio AS. The remaining authors disclose no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Słomka, A.; Kowalewski, M.; Żekanowska, E. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Short Review on Hematological Manifestations. *Pathogens* **2020**, *9*, 493. [[CrossRef](#)]
2. Song, P.; Li, W.; Xie, J.; Hou, Y.; You, C. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. *Clin. Chim. Acta* **2020**, *509*, 280–287. [[CrossRef](#)]

3. Dastoli, S.; Bennardo, L.; Patruno, C.; Nisticò, S.P. Are erythema multiforme and urticaria related to a better outcome of COVID-19? *Dermatol. Ther.* **2020**, *33*, e13681. [[CrossRef](#)]
4. Bellido-Martín, L.; de Frutos, P.G. Vitamin K-dependent actions of Gas6. *Vitam. Horm.* **2008**, *78*, 185–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dattola, A.; Silvestri, M.; Bennardo, L.; Passante, M.; Scali, E.; Patruno, C.; Nisticò, S.P. Role of Vitamins in Skin Health: A Systematic Review. *Curr. Nutr. Rep.* **2020**, *9*, 226–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Salmi, L.; Gavelli, F.; Patrucco, F.; Caputo, M.; Avanzi, G.C.; Castello, L.M. Gas6/TAM Axis in Sepsis: Time to Consider Its Potential Role as a Therapeutic Target. *Dis. Markers* **2019**, 6156493. [[CrossRef](#)]
7. Ekman, C.; Linder, A.; Akesson, P.; Dahlbäck, B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit. Care* **2010**, *14*, R158. [[CrossRef](#)]
8. Stalder, G.; Que, Y.A.; Calzavarini, S.; Burnier, L.; Kosinski, C.; Ballabeni, P.; Roger, T.; Calandra, T.; Duchosal, M.A.; Liaudet, L.; et al. Study of Early Elevated Gas6 Plasma Level as a Predictor of Mortality in a Prospective Cohort of Patients with Sepsis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Yeh, L.C.; Huang, P.W.; Hsieh, K.H.; Wang, C.H.; Kao, Y.K.; Lin, T.H.; Lee, X.L. Elevated Plasma Levels of Gas6 Are Associated with Acute Lung Injury in Patients with Severe Sepsis. *Tohoku J. Exp. Med.* **2017**, *243*, 187–193. [[CrossRef](#)]
10. Gibot, S.; Massin, F.; Cravoisy, A.; Dupays, R.; Barraud, D.; Nace, L.; Bollaert, P.E. Growth arrest-specific protein 6 plasma concentrations during septic shock. *Crit. Care* **2007**, *11*, R8. [[CrossRef](#)]
11. Borgel, D.; Clauser, S.; Bornstain, C.; Bièche, I.; Bissery, A.; Remones, V.; Fagon, J.Y.; Aiach, M.; Diehl, J.L. Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* **2006**, *34*, 219–222. [[CrossRef](#)]
12. Wang, S.; Qiu, Z.; Hou, Y.; Deng, X.; Xu, W.; Zheng, T.; Wu, P.; Xie, S.; Bian, W.; Zhang, C.; et al. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res.* **2021**, *8*, 1–15. [[CrossRef](#)]
13. Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, Å.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **2015**, *347*, 1260419. [[CrossRef](#)]
14. Grabiec, A.M.; Denny, N.; Doherty, J.A.; Happonen, K.E.; Hankinson, J.; Connolly, E.; Fife, M.E.; Fujimori, T.; Fujino, N.; Goenka, A.; et al. Diminished airway macrophage expression of the Axl receptor tyrosine kinase is associated with defective efferocytosis in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140*, 1144–1146.e14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chen, Y.; Wang, J.; Liu, C.; Su, L.; Zhang, D.; Fan, J.; Yang, Y.; Xiao, M.; Xie, J.; Xu, Y.; et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol. Med.* **2020**, *26*, 97. [[CrossRef](#)]
16. Levin, P.A.; Brekken, R.A.; Byers, L.A.; Heymach, J.V.; Gerber, D.E. Axl Receptor Axis: A New Therapeutic Target in Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2016**, *11*, 1357–1362. [[CrossRef](#)]
17. Shibata, T.; Makino, A.; Ogata, R.; Nakamura, S.; Ito, T.; Nagata, K.; Terauchi, Y.; Oishi, T.; Fujieda, M.; Takahashi, Y.; et al. Respiratory syncytial virus infection exacerbates pneumococcal pneumonia via Gas6/Axl-mediated macrophage polarization. *J. Clin. Investig.* **2020**, 125505. [[CrossRef](#)]
18. Ni, J.; Lin, M.; Jin, Y.; Li, J.; Guo, Y.; Zhou, J.; Hong, G.; Zhao, G.; Lu, Z. Gas6 Attenuates Sepsis-Induced Tight Junction Injury and Vascular Endothelial Hyperpermeability via the Axl/NF-κB Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 662. [[CrossRef](#)]
19. Tjwa, M.; Bellido-Martín, L.; Lin, Y.; Lutgens, E.; Plaisance, S.; Bono, F.; Delesque-Touchard, N.; Hervé, C.; Moura, R.; Billiau, A.D.; et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood* **2008**, *111*, 4096–4105. [[CrossRef](#)]
20. Bárcena, C.; Stefanovic, M.; Tutusaus, A.; Joannas, L.; Menéndez, A.; García-Ruiz, C.; Sancho-Bru, P.; Marí, M.; Caballeria, J.; Rothlin, C.V.; et al. Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 670–678. [[CrossRef](#)]
21. Tutusaus, A.; de Gregorio, E.; Cucarull, B.; Cristóbal, H.; Aresté, C.; Graupera, I.; Coll, M.; Colell, A.; Gausdal, G.; Lorens, J.B.; et al. A functional role of GAS6/TAM in non-alcoholic steatohepatitis progression implicates AXL as therapeutic target. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *9*, 349–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lee, I.J.; Hilliard, B.; Swami, A.; Madara, J.C.; Rao, S.; Patel, T.; Gaughan, J.P.; Lee, J.; Gadegbeku, C.A.; Choi, E.T.; et al. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) levels are elevated in patients with chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 4166–4172. [[CrossRef](#)]
23. Fujino, N.; Brand, O.J.; Morgan, D.J.; Fujimori, T.; Grabiec, A.M.; Jagger, C.P.; Maciewicz, R.A.; Yamada, M.; Itakura, K.; Sugiura, H.; et al. Sensing of apoptotic cells through Axl causes lung basal cell proliferation in inflammatory diseases. *J. Exp. Med.* **2019**, *216*, 2184–2201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Battle, M.; Recarte-Pelz, P.; Roig, E.; Castel, M.A.; Cardona, M.; Farrero, M.; Ortiz, J.T.; Campos, B.; Pulgarín, M.J.; Ramírez, J.; et al. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *Int. J. Cardiol.* **2014**, *173*, 402–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dofferhoff, A.S.M.; Piscaer, I.; Schurgers, L.J.; Visser, M.P.J.; van den Ouweland, J.M.W.; A De Jong, P.; Gosens, R.; Hackeng, T.M.; Van Daal, H.; Lux, P.; et al. Reduced vitamin K status as a potentially modifiable risk factor of severe COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, ciaa1258. [[CrossRef](#)]
26. Ménager, P.; Brière, O.; Gautier, J.; Riou, J.; Sacco, G.; Brangier, A.; Annweiler, C.; GERIA-COVID Study Group. Regular Use of VKA Prior to COVID-19 Associated with Lower 7-Day Survival in Hospitalized Frail Elderly COVID-19 Patients: The GERIA-COVID Cohort Study. *Nutrients* **2021**, *13*, 39. [[CrossRef](#)]

27. Tutusaus, A.; Mari, M.; Ortiz-Pérez, J.T.; Nicolaes, G.A.F.; Morales, A.; García de Frutos, P. Role of Vitamin K-Dependent Factors Protein S and GAS6 and TAM Receptors in SARS-CoV-2 Infection and COVID-19-Associated Immunothrombosis. *Cells* **2020**, *9*, 2186. [[CrossRef](#)]
28. Hunt, C.L.; Kolokoltsov, A.A.; Davey, R.A.; Maury, W. The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *J. Virol.* **2011**, *85*, 334–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Meertens, L.; Labeau, A.; Dejarnac, O.; Cipriani, S.; Sinigaglia, L.; Bonnet-Madin, L.; Le Charpentier, T.; Hafirassou, M.L.; Zamborlini, A.; Cao-Lormeau, V.M.; et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 324–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bohan, D.; Van Ert, H.; Ruggio, N.; Rogers, K.; Stokowy, T.; Gausdal, G.; Jackson, A.; Micklem, D.; Lorens, J.; Maury, W. Targeting of the Receptor Tyrosine Kinase AXL by Bemcentinib prevents SARS-CoV-2 infection. In Proceedings of the Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Online, 6–10 March 2021.

DISCUSIÓN

4. Discusión

Los miembros de la familia TAM (TYRO3, AXL, MERTK) y sus ligandos (GAS6 y PROS1) se han visto implicados en el desarrollo de varias patologías caracterizadas por eventos inflamatorios, autoinmunes, fibróticos y antiapoptóticos (15,44,46,71). Esto se debe en parte a que diversos estudios han visto que los valores de estas proteínas están alterados en sangre y otros fluidos, y frecuentemente se correlacionan con la gravedad de diferentes patologías. Debido a ello, tanto los ligandos como las formas solubles y de membrana de los receptores TAM se están postulando como candidatos a biomarcadores de estas patologías, y creciendo el interés en su aplicación en el diagnóstico, pronóstico y/o estrategia terapéutica (28).

El cáncer de páncreas no es uno de los cánceres con mayor incidencia, pero sí uno de los más mortíferos. Esto se debe a que esta patología es asintomática en sus fases iniciales, y en el momento del diagnóstico ya es demasiado tarde para proceder a un tratamiento que resulte exitoso. A día de hoy no existen métodos eficaces para poder hacer un diagnóstico precoz, por lo que el descubrimiento de biomarcadores específicos sería primordial para aumentar la supervivencia de estos pacientes (164,167).

El biomarcador que se utiliza actualmente en clínica para diagnosticar el PDAC, el tipo de cáncer de páncreas más común, es CA19-9. Este carbohidrato en plasma ayuda a al diagnóstico, pero no es capaz de discriminar entre PDAC y la pancreatitis crónica (PC), además de estar elevado en otras patologías, como carcinoma hepatocelular (*Hepatocellular carcinoma*, HCC), cáncer colorectal, cáncer de mama y cáncer ampular (231–233). Por estas razones, la utilización de CA19-9 es insuficiente para un análisis específico de PDAC, necesitándose de otros biomarcadores para poder contrastar la decisión diagnóstica.

Estudios previos han demostrado la expresión de AXL en muestras histológicas y líneas celulares PDAC, asociando su incremento con una mayor invasión celular y peor pronóstico (190,234). Estos hallazgos han animado a indagar más sobre el papel de AXL en PDAC y su posible uso como herramienta diagnóstica y/o terapéutica.

En nuestro estudio sobre PDAC hemos obtenido resultados similares a estudios anteriores respecto a su expresión celular. La mayor presencia de AXL en inmunohistoquímica se observó en tumores de

pacientes de PDAC y aquellos que tienen lesiones neoplasias mucinosas papilares intraductales (IPMN). Por el contrario, las muestras de pacientes con neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN) expresan AXL de forma moderada, mientras que las de pacientes sanos y PC, su expresión es casi indetectable (Figura 1 del artículo 1). Aun así, obtuvimos que algunos tumores de PDAC no expresan AXL, lo que hace pensar que la expresión de AXL puede depender del subtipo de PDAC con el que estemos tratando. Estos resultados irían en sintonía con los análisis realizados con las bases de datos de ARN, los cuales muestran una mayor expresión de AXL en el subtipo escamoso/basal de PDAC. Además, el hecho que los tumores con lesiones IPMN tengan una mayor expresión que los de las lesiones PanIN, podría indicar que la expresión de este receptor se origina, en parte, a partir de estas lesiones preneoplásicas. Adicionalmente, la variabilidad en la expresión de AXL también podría depender del nivel de hipoxia presente en el tumor, ya que se ha visto que AXL puede ser estimulado por HIF-1, asociándose con un peor pronóstico (103).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que sAXL circulante podría ayudar al diagnóstico precoz, ya que sus niveles en plasma de pacientes están significativamente aumentados respecto a pacientes sanos y pacientes con PC. Este hallazgo supone un gran avance, ya que la medición de proteínas en sangre es una técnica rápida, no invasiva para el paciente y de bajo coste.

Mediante el análisis por ELISA de los plasmas de pacientes humanos (Figura 3 del artículo), mostramos que los niveles de sAXL están elevados de forma significativa en pacientes con PDAC, mientras que los pacientes sanos y con PC muestran niveles menores. Aunque, el grupo de PC presenta mayor concentración de sAXL que los controles sanos, la diferencia no es significativa. Los resultados de los ELISAs junto a los obtenidos a partir de las bases de datos de ARN, muestran que los niveles de sAXL se correlacionan negativamente con el pronóstico del paciente. No obstante, estos niveles no se modifican paralelamente con el estadio de la patología, lo que indica que la sobreexpresión de AXL ocurre en las fases iniciales del desarrollo de PDAC.

Otro aspecto importante obtenido en este apartado es la capacidad de sAXL de discriminar los pacientes PDAC y PC, y sus ventajas respecto al biomarcador CA19-9. Para analizarlo, hicimos un análisis de ROC (Figura 5 del artículo) y obtuvimos que la sensibilidad y especificidad de sAXL individualmente en nuestro estudio fueron de un 65% y 100% respectivamente para la discriminación entre PDAC y PC, mientras que la de CA19-9 fue de un 46.8% y 92.3%. No obstante, si hacemos el análisis de forma conjunta, las mediciones de sAXL y CA19-9 mejoran tanto la sensibilidad (89.9%) como la especificidad (100%). Otro estudio con la cohorte que usamos de HMar determinó que los

niveles de Galectina-1 en plasma se encuentran elevados, aunque no hay diferencias significativas entre PDAC y PC, pero sí comparados con el grupo control (235). Por tanto, si incluimos en el análisis sAXL, CA19-9 y Galectina-1, aumentan hasta el 100% la especificidad y la sensibilidad para el diagnóstico de PDAC respecto al grupo control. Estos resultados ponen en valor el poder diagnóstico de sAXL indicando que su combinación con otros marcadores, permite optimizar la diferenciación entre pacientes sanos, con PDAC y PC.

Para asegurar que la expresión de AXL proviene de las células tumorales, usamos líneas celulares humanas determinando que las líneas PDAC son capaces de liberar sAXL en el medio condicionado, un aspecto que no se había estudiado anteriormente (Figura 2 del artículo 1). Cabe reseñar que se observó una cierta heterogeneidad en la expresión de AXL en las diferentes líneas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en inmunohistoquímica y las bases de datos de ARN. La secreción de sAXL era proporcional a la expresión endógena de la proteína.

Para reforzar la idea que la sobreexpresión de sAXL es específico en PDAC y no común en otros tipos de tumores pancreáticos, utilizamos los modelos de ratón KRAS y c-MYC (Figura 7 del artículo). Los ratones KRAS son el modelo por excelencia para reproducir esta patología (236), mientras que los c-MYC se usan como modelo de posible inicio de PDAC y otros tumores pancreáticos (237). Mediante la técnica de ELISA vimos que los ratones que han desarrollado tumor expresan niveles de sAXL en plasma muy superiores, comparado con el grupo control, los KRAS con lesiones preneoplásicas que no han desarrollado tumor y los ratones c-MYC con carcinomas acinares, confirmando la especificidad de sAXL por los tumores pancreáticos PDAC.

Cabe decir que nuestro estudio presenta diversas limitaciones. En primer lugar, la expresión de AXL en tejido y sAXL en plasma es heterogénea. Esto puede deberse a que AXL está aumentado en otras patologías, como insuficiencia cardíaca, carcinoma hepatocelular o lupus, y en situaciones de inflamación aguda (44,130,224,238,239). Esta circunstancia podría provocar falsos positivos en las mediciones para el diagnóstico de PDAC. Aun así, estas patologías suelen estar ya diagnosticadas, por lo que estos pacientes deberían ser descartados para el análisis. Además, observamos la existencia de pacientes diagnosticados con PDAC que expresan niveles de sAXL más bajos que la media y similares al grupo control, por lo que podría detectarse falsos negativos.

Esta variabilidad en la expresión de AXL refuerza la idea de la necesidad de combinar diferentes biomarcadores para un óptimo diagnóstico. Por ejemplo, en nuestro estudio hemos visto que si

añadimos CA19-9 en las mediciones, la sensibilidad y especificidad aumentan considerablemente. Por ello, proponemos el uso de un panel con biomarcadores que incluya diferentes proteínas plasmáticas propuestos para el diagnóstico de PDAC, como CA19-9, Galectina-1, CEA, trombospondina-2, MUC5AC, CA-50, MIC-1, molécula de adhesión celular relativa al antígeno carcinoembriónico (*CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule-1*, CEACAM-1), osteopontina, entre otros (235,240,241).

En conclusión, no podemos decir que sAXL por si solo pueda ser un biomarcador definitivo para el diagnóstico de PDAC o PC. Sin embargo, la combinación de sAXL con otros biomarcadores, como por ejemplo usando un panel proteico, permitiría el diagnóstico de esta patología de una forma más precisa. Para ello, sería necesario aumentar el tamaño muestral del estudio, con pacientes de otros centros, y así poder fijar con mayor exactitud los límites de los valores que se considerarían significativamente altos, normales o bajos.

La COVID-19 es una patología provocada por el virus SARS-CoV-2, originada en diciembre de 2019 en Wuhan, China. Desde ahí fue propagándose al resto de países, provocando una pandemia mundial y una crisis sanitaria y económica. A raíz de estos hechos, multitud de laboratorios y empresas se han esmerado en encontrar una prevención de la infección y/o un tratamiento efectivo para combatirla (200,210).

En nuestro estudio, tras una medición por ELISA de plasmas de pacientes que acudieron a urgencias durante la primera ola de la pandemia, se evidenció que los niveles de GAS6 estaban aumentados en pacientes que necesitaron hospitalización respecto a pacientes con PCR negativa, aunque los niveles eran superiores en aquellos pacientes que fallecieron (Figura 1 del artículo 2). Estos resultados son acordes con los obtenidos en otros dos estudios posteriores desarrollados por otros grupos de investigación en cohortes de pacientes diferentes y en momentos diferentes de la pandemia (242,243). Asimismo, también se ha visto la participación de GAS6, PROS1 y los receptores TAM en la inmunotrombosis provocada por la infección de SARS-CoV-2 (115). La interpretación de estos resultados sugiere que GAS6 aumenta de manera transitoria según la gravedad de la infección y sus niveles persistentemente elevados se asocian a un peor pronóstico, por lo que la cuantificación de GAS6 en el momento de hospitalización podría ayudar a predecir el desarrollo y final de la enfermedad.

En nuestro análisis de plasmas, obtuvimos también que la concentración de sAXL en plasma estaba aumentada en pacientes que fallecieron, comparado con pacientes con PCR negativa y aquellos que hospitalizaron, pero sobrevivieron (Figura 2 del artículo 2). Estos datos, junto a los nuestros de GAS6 y otras investigaciones (57), podrían sugerir que AXL, presente en gran proporción en macrófagos alveolares y del tracto respiratorio (Figura 4 del artículo 2), es un posible correceptor de SARS-CoV-2 junto a ACE2. Esta actuación no sería de extrañar, ya que anteriormente se ha reportado que AXL funciona como receptor para otros tipos de virus, como el Ébola, Zika y Dengue (59,107,244). En este sentido, cabe resaltar que recientemente se ha reportado la capacidad de AXL de facilitar la infección de SARS-CoV-2, en línea con nuestros resultados, a la vez que sugieren su inhibición como estrategia terapéutica frente al COVID-19.

La característica molecular de la infección por SARS-CoV-2 más conocida es la tormenta de citoquinas proinflamatorias, la cual puede provocar un fallo multiorgánico y choque séptico, letal para el paciente (218). Para comprobar la participación del sistema GAS6/AXL en condiciones proinflamatorias, tratamos las células THP-1 (ya diferenciadas a macrófagos por la inducción con PMA) con LPS, GAS6 recombinante, anti-AXL y bemcentinib, y analizamos la inducción de citoquinas proinflamatorias: IL-1 β , TNF y CCL2/MCP-1. Observamos que la inhibición de AXL con bemcentinib provocó en una disminución de la expresión de estas citoquinas, sobre todo de CCL2/MCP-1, aunque el tratamiento con GAS6 no mostró ningún efecto adicional (Figuras 5 y 6 del artículo 2), posiblemente sugiriendo una activación basal de la vía GAS6/AXL tras la diferenciación a macrófagos sin necesidad de administrar GAS6 recombinante.

Como conclusión de este estudio, podemos decir que los niveles de GAS6 en plasma podría indicar la gravedad de la infección por SARS-CoV-2, por lo que su medición en el momento de hospitalización podría ayudar o guiar a la elección de un tratamiento particular. Para ello, harían falta más estudios para poder confirmar estos resultados en una cohorte más amplia de individuos, quizás permitiendo la identificación de colectivos entre los cuales su uso clínico fuera particularmente recomendable.

Cabe decir que el momento en que hicimos el estudio, en marzo de 2020, solamente estaba presente la variante alfa de SARS-CoV-2, no estaba aprobada ninguna vacuna y no había disposición de herramientas sofisticadas para simular la infección de este virus *in vitro*. Por lo que sería interesante, además de aumentar la cantidad de muestras de plasmas de las diferentes olas que han surgido, ver qué efectos o cómo se comportan los miembros de la familia TAM y GAS6 en las diferentes cepas, tras las vacunas y/o reinfecciones.

Por otra parte, tanto nosotros como otros grupos han demostrado la inhibición específica y eficaz de AXL con bemcentinib (71,151). Bajo la sospecha de que AXL puede favorecer la entrada de SARS-CoV-2 y controlar la producción de citoquinas inflamatorias por los macrófagos, nuestros resultados avalan el uso de bemcentinib u otros inhibidores para la prevención y tratamiento de la COVID-19. En este sentido, con posterioridad a nuestra publicación, se iniciaron estudios clínicos en diferentes países (Reino Unido, Noruega, Francia o Sudáfrica, entre otros) con bemcentinib para prevenir/tratar esta patología.

Por último, nuestros experimentos in vitro con las células THP-1 deberían volver a ser reproducidos con otras moléculas víricas, ya que el LPS es una sustancia de procedencia bacteriana, ergo no es un modelo adecuado para simular la infección vírica. Para ello, se podría utilizar moléculas que, por ejemplo, sean similares a la proteína *Spike* del virus.

En resumen, el uso de GAS6 y los TAMs como biomarcadores ha sido evidenciado, no solamente en PDAC y COVID-19, sino en otras patologías caracterizadas por procesos inflamatorios, fibróticos, antiapoptóticos y autoinmunes. La selectividad y especificidad de AXL podría aportar un valor añadido a paneles con otros biomarcadores ya conocidos de cada patología. Esto sería especialmente útil en pacientes con gran susceptibilidad o predisposición a padecer una patología en concreto.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

En el estudio de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) podemos concluir que el nivel de AXL en suero puede ser un buen biomarcador para el diagnóstico temprano y pronóstico de PDAC, siendo capaz de diferenciarlo de Pancreatitis Crónica (CP).

La inclusión de sAXL en paneles de detección de tumores pancreáticos, conjuntamente con CA19-9 y GAS6, podría proporcionar un valor de diagnóstico adicional, acelerar la resección quirúrgica e identificar pacientes susceptibles de tratamiento específico (con inhibidores de GAS6/AXL).

Del estudio de COVID-19 concluimos que la concentración de GAS6 en plasma podría ser un marcador de la severidad de la infección vírica, e indicativo de pronóstico del paciente.

La inhibición del sistema GAS6/AXL con bemcentinib reduce la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos humanos, sugiriendo un rol importante en la respuesta inmunitaria frente a la COVID-19, subrayando su interés como diana terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

1. Van Der Meer JHM, Van Der Poll T, Van't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: Roles in inflammation and hemostasis. *Blood*. 2014;123(16):2460–9.
2. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(11):1–17.
3. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, et al. Axl, a Transforming Gene Isolated From Primary Human Myeloid Leukemia Cells, Encodes a Novel Receptor Tyrosine Kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 1991;11(10):5016–31.
4. Polvi A, Armstrong E, Lai G, Lemke G, Huebner K, Spritz RA, et al. The human TYROS gene and pseudogene are located in chromosome 15q14-q25. *Gene*. 1993;134(2):289–93.
5. Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth and Differentiation*. 1994;5(6):647–57.
6. Davra V, Kimani SG, Calianese D, Birge RB. Ligand activation of TAM family receptors-implications for tumor biology and therapeutic response. *Cancers (Basel)*. 2016;8(12).
7. Lapraz F, Röttinger E, Duboc V, Range R, Duloquin L, Walton K, et al. RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev Biol*. 2006 Dec;300(1):132–52.
8. Satou Y, Sasakura Y, Yamada L, Imai KS, Satoh N, Degnan B. A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. *Development Genes and Evolution* 2003 213:5. 2003 May 9;213(5):254–63.
9. Wheeler DL, Yarden Y. Receptor tyrosine kinases: Structure, functions and role in human disease. *Receptor Tyrosine Kinases: Structure, Functions and Role in Human Disease*. 2015 Jan 1;1–440.
10. Evans AL, Blackburn JWD, Taruc K, Kipp A, Dirk BS, Hunt NR, et al. Antagonistic Coevolution of MER Tyrosine Kinase Expression and Function. *Mol Biol Evol*. 2017;34(7):1613–28.
11. Karlsson M, Zhang C, Méar L, Zhong W, Digre A, Katona B, et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Science Advances*. 2021;7(31):1–9.
12. Post SM, Andreeff M, DiNardo C, Khoury JD, Ruvolo PP. TAM kinases as regulators of cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2021;1868(6):118992.
13. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(5):327–36.
14. Lee CH, Chun T. Anti-inflammatory role of tam family of receptor tyrosine kinases via modulating macrophage function. *Molecules and Cells*. 2019;42(1):1–7.
15. Axelrod H, Pienta KJ. Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget*. 2014;5(19):8818–52.
16. Zhu C, Wei Y, Wei X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: Functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Molecular Cancer*. 2019;18(1):153.

17. Kulman JD, Harris JE, Nakazawa N, Ogasawara M, Satake M, Davie EW. Vitamin K-dependent proteins in *Ciona intestinalis*, a basal chordate lacking a blood coagulation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(43):15794–9.
18. Hafizi S, Dahlbäck B. Gas6 and protein S: Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS Journal*. 2006;273(23):5231–44.
19. Sadahiro H, Kang KD, Gibson JT, Minata M, Yu H, Shi J, et al. Activation of the receptor tyrosine kinase AXL regulates the immune microenvironment in glioblastoma. *Cancer Research*. 2018;78(11):3002–13.
20. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(7):1311–20.
21. Gierula M, Ahnström J. Anticoagulant protein S—New insights on interactions and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020;18(11):2801–11.
22. Grupta A, Tun AM, Grupta K, Tuma F. Protein S Deficiency - PubMed. *StatPearls*. 2022.
23. García De Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 2007;98(2):543–56.
24. Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G. Lack of Protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(10):2942–53.
25. Fernández-Fernández L, Bellido-Martín L, García de Frutos P. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6): An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008;100(4):604–10.
26. Lemke G. Phosphatidylserine Is the Signal for TAM Receptors and Their Ligands. *Trends in Biochemical Sciences*. 2017;42(9):738–48.
27. Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Göhring W, Ullrich A, et al. Structural basis for Gas6–Axl signalling. *The EMBO Journal*. 2006;25(1):80–7.
28. di Stasi R, de Rosa L, D’Andrea LD. Therapeutic aspects of the Axl/Gas6 molecular system. *Drug Discovery Today*. 2020;25(12):2130–48.
29. Amara A, Mercer J. Viral apoptotic mimicry. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(8):461–9.
30. Tanaka M, Siemann DW. Gas6/Axl signaling pathway in the tumor immune microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1–14.
31. Graham DK, Deryckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: Phosphatidylserine-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(12):769–85.
32. Lew ED, Oh J, Burrola PG, Lax I, Zagórska A, Través PG, et al. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife*. 2014;3:1–23.
33. Fridell YW, Jin Y, Quilliam LA, Burchert A, McCloskey P, Spizz G, et al. Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(1):135–45.

34. Braunger J, Schleithoff L, Schulz AS, Kessler H, Lammers R, Ullrich A, et al. Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene*. 1997;14(22):2619–31.
35. Wang J, Yu C, Zhuang J, Qi W, Jiang J, Liu X, et al. The role of phosphatidylserine on the membrane in immunity and blood coagulation. *Biomarker Research*. 2022;10(1):1–23.
36. Wium M, Ajayi-smith AF, Paccez JD, Zerbini LF. The role of the receptor tyrosine kinase axl in carcinogenesis and development of therapeutic resistance: An overview of molecular mechanisms and future applications. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7).
37. Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Molecular and Cellular Biology*. 1995;15(2):614–25.
38. Burchert A, Attar EC, McCloskey P, Fridell YWC, Liu ET. Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1998;16(24):3177–87.
39. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology*. 2007;178(9):5635–42.
40. Pierce A, Bliesner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, Lemke G, Tobet S, et al. Axl and Tyro3 Modulate Female Reproduction by Influencing Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Survival and Migration. *Molecular Endocrinology*. 2008 Nov;22(11):2481.
41. Caberoy NB, Zhou Y, Li W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO Journal*. 2010;29(23):3898–910.
42. Wium M, Paccez JD, Zerbini LF. The dual role of TAM receptors in autoimmune diseases and cancer: An overview. *Cells*. 2018;7(10):1–19.
43. Rothlin CV, Carrera-Silva EA, Bosurgi L, Ghosh S. TAM Receptor Signaling in Immune Homeostasis. *Annual Review of Immunology*. 2015;33(1):355–91.
44. Hurtado B, de Frutos PG. GAS6 in systemic inflammatory diseases: With and without infection. *Critical Care*. 2010;14(5):9–10.
45. Wang H, Chen Y, Ge Y, Ma P, Ma Q, Ma J, et al. Immunoexpression of Tyro 3 family receptors - Tyro 3, Axl, and Mer - And their ligand Gas6 in postnatal developing mouse testis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2005;53(11):1355–64.
46. Rothlin C V., Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. *Cell*. 2007;131(6):1124–36.
47. Gould WR, Baxi SM, Schroeder R, Peng YW, Leadley RJ, Peterson JT, et al. Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(4):733–41.
48. Angelillo-Scherrer A, De Frutos PG, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nature Medicine*. 2001;7(2):215–21.
49. Cosemans JMEM, Van Kruchten R, Olieslagers S, Schurgers LJ, Verheyen FK, Munnix ICA, et al. Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(8):1797–808.

50. Caraux A, Lu Q, Fernandez N, Riou S, Di Santo JP, Raulet DH, et al. Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nature Immunology*. 2006;7(7):747–54.
51. Kim EM, Lee EH, Lee HY, Choi HR, Ji KY, Kim SM, et al. Axl signaling induces development of natural killer cells in vitro and in vivo. *Protoplasma*. 2017;254(2):1091–101.
52. Park IK, Trotta R, Yu J, Caligiuri MA. Axl/Gas6 pathway positively regulates FLT3 activation in human natural killer cell development. *Eur J Immunol*. 2013 Oct;43(10):2750–5.
53. Gjerdrum C, Tiron C, Høiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(3):1124–9.
54. Myers K V., Amend SR, Pienta KJ. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): Implications for macrophages in the tumor microenvironment. *Molecular Cancer*. 2019;18(1):1–14.
55. Gadiyar V, Patel G, Davra V. Immunological role of TAM receptors in the cancer microenvironment. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2020 Jan 1;357:57–79.
56. Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman CM, Coan JP, et al. AXL Is a Logical Molecular Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015 Jun 1;21(11):2601–12.
57. Wang S, Qiu Z, Hou Y, Deng X, Xu W, Zheng T, et al. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Research*. 2021;31(2):126–40.
58. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*. 2017;18(2):324–33.
59. Strange DP, Jiyarom B, Zarandi NP, Xie X, Baker C, Sadri-Ardekani H, et al. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral. *American Society for Microbiology*. 2019;10(4):1–16.
60. Beutler B. Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*. 2004;40(12):845–59.
61. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(11):823–35.
62. Vázquez MB, Sureda M, Rebollo J. Dendritic cells I: Basic biology and functions. *Inmunologia*. 2012;31(1):21–30.
63. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cellular and Molecular Immunology*. 2013 Mar;10(2):103.
64. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Seminars in Immunology*. 2007 Feb 1;19(1):24–32.
65. Scutera S, Fraone T, Musso T, Cappello P, Rossi S, Pierobon D, et al. Survival and migration of human dendritic cells are regulated by an IFN-alpha-inducible Axl/Gas6 pathway. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3004–13.
66. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, Lutgens E, Plaisance S, Bono F, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood*. 2008;111(8):4096–105.
67. Robins RS, Lemarié CA, Laurance S, Aghourian MN, Wu J, Blostein MD. Vascular Gas6 contributes to thrombogenesis and promotes tissue factor up-regulation after vessel injury in mice. *Blood*. 2013;121(4):692–9.

68. Laurance S, Bertin FR, Ebrahimian T, Kassim Y, Rys RN, Lehoux S, et al. Gas6 Promotes Inflammatory (CCR2hiCX3CR1lo) Monocyte Recruitment in Venous Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017;37(7):1315–22.
69. Reinhardt C. GAS6: Pouring GASoline into the Inflammatory Inferno of Venous Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017;37(7):1263–5.
70. Batchu SN, Xia J, Ko KA, Doyley MM, Abe JI, Morrell CN, et al. Axl modulates immune activation of smooth muscle cells in vein graft remodeling. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2015 Sep 18;309(6):H1048.
71. Tutusaus A, de Gregorio E, Cucarull B, Cristóbal H, Aresté C, Graupera I, et al. A Functional Role of GAS6/TAM in Nonalcoholic Steatohepatitis Progression Implicates AXL as Therapeutic Target. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2020;9(3):349–68.
72. DeBerge M, Ginton K, Subramanian M, Wilsbacher LD, Rothlin C V., Tabas I, et al. Macrophage AXL receptor tyrosine kinase inflames the heart after reperfused myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(6).
73. Fukatsu M, Ohkawara H, Wang X, Alkebsi L, Furukawa M, Mori H, et al. The suppressive effects of Mer inhibition on inflammatory responses in the pathogenesis of LPS-induced ALI/ARDS. *Science Signaling*. 2022 Mar 8;15(724).
74. Peng CK, Wu CP, Lin JY, Peng SC, Lee CH, Huang KL, et al. Gas6/Axl signaling attenuates alveolar inflammation in ischemia-reperfusion-induced acute lung injury by up-regulating SOCS3-mediated pathway. *PLoS ONE*. 2019;14(7):1–17.
75. Demarest SJ, Gardner J, Vendel MC, Ailor E, Szak S, Huang F, et al. Evaluation of Tyro3 expression, Gas6-mediated akt phosphorylation, and the impact of anti-Tyro3 antibodies in melanoma cell lines. *Biochemistry*. 2013;52(18):3102–18.
76. Zhu S, Wurdak H, Wang Y, Galkin A, Tao H, Li J, et al. A genomic screen identifies TYRO3 as a MITF regulator in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(40):17025–30.
77. Holtzhausen A, Harris W, Ubil E, Hunter DM, Zhao J, Zhang Y, et al. TAM Family Receptor Kinase Inhibition Reverses MDSC-Mediated Suppression and Augments Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(10):1672–86.
78. Hsu PL, Jou J, Tsai SJ. TYRO3: A potential therapeutic target in cancer. *Experimental Biology and Medicine*. 2019;244(2):83–99.
79. Smart SK, Vasileiadi E, Wang X, DeRyckere D, Graham DK. The emerging role of TYRO3 as a therapeutic target in cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12):1–27.
80. Davra V, Kumar S, Geng K, Calianese D, Mehta D, Gadiyar V, et al. Axl and Mertk Receptors Cooperate to Promote Breast Cancer Progression by Combined Oncogenic Signaling and Evasion of Host Antitumor Immunity. *Cancer Res*. 2021 Feb 1;81(3):698–712.
81. Cummings CT, DeRyckere D, Earp HS, Graham DK. Molecular pathways: MERTK signaling in cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 1;19(19):5275–80.
82. Falcone I, Conciatori F, Bazzichetto C, Bria E, Carbognin L, Malaguti P, et al. AXL receptor in breast cancer: Molecular involvement and therapeutic limitations. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(22):1–23.

83. Du W, Brekken RA. Does Axl have potential as a therapeutic target in pancreatic cancer? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2018;22(11):955–66.
84. Du W, Phinney NZ, Huang H, Wang Z, Westcott J, Toombs JE, et al. AXL is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. 2022;19(8):1412–21.
85. Bellomo G, Rainer C, Quaranta V, Astuti Y, Raymant M, Boyd E, et al. Chemotherapy-induced infiltration of neutrophils promotes pancreatic cancer metastasis via Gas6/AXL signalling axis. *Gut*. 2022;gutjnl-2021-325272.
86. Martinelli E, Martini G, Cardone C, Troiani T, Liguori G, Vitagliano D, et al. AXL is an oncotarget in human colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015;6(27):23281–96.
87. Pang X, Wang Y, Miao B, Fei S, Chen W. Regulation of ARL2 in colorectal cancer cell proliferation and tumorigenicity, and its negative association with AXL. *Oncology Letters*. 2021;21(3):1–10.
88. Ramkumar K, Stewart CA, Cargill KR, Corte CM Della, Shen L, Diao L, et al. AXL inhibition induces DNA damage and replication stress in non-small cell lung cancer cells and promotes sensitivity to ATR inhibitors. *Mol Cancer Res*. 2021;19(3):485–97.
89. Choi JY, Lee H, Kwon EJ, Kong HJ, Kwon OS, Cha HJ. TGF β promotes YAP-dependent AXL induction in mesenchymal-type lung cancer cells. *Molecular Oncology*. 2021;15(2):679–96.
90. Tsai WB, Long Y, Park JR, Chang JT, Liu H, Rodriguez-Canales J, et al. Gas6/Axl is the sensor of arginine-auxotrophic response in targeted chemotherapy with arginine-depleting agents. *Oncogene*. 2016;35(13):1632–42.
91. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*. 1999;18(29):4224–36.
92. Fang S, Luo Y, Zhang Y, Wang H, Liu Q, Li X, et al. NTNG1 Modulates Cisplatin Resistance in Epithelial Ovarian Cancer Cells via the GAS6/AXL/Akt Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9(July):1–11.
93. Wang C, Jin H, Wang N, Fan S, Wang Y, Zhang Y, et al. Gas6/Axl axis contributes to chemoresistance and metastasis in breast cancer through Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling. *Theranostics*. 2016;6(8):1205–19.
94. Babaei G, Aziz SGG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;133(November 2020):110909.
95. Saitoh M. Cellular plasticity in epithelial homeostasis and diseases: Involvement of partial EMT in cancer progression. *Journal of Biochemistry*. 2018;164(4):257–64.
96. Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese Journal of Cancer*. 2011;30(9):603–11.
97. Polireddy K, Chen Q. Cancer of the pancreas: Molecular pathways and current advancement in treatment. *J Cancer*. 2016;7(11):1497–514.
98. Wang Y, Liu J, Ying X, Lin PC, Zhou BP. Twist-mediated Epithelial-mesenchymal Transition Promotes Breast Tumor Cell Invasion via Inhibition of Hippo Pathway. *Scientific Reports*. 2016;6(January):1–10.
99. Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese Journal of Cancer*. 2011;30(9):603–11.

100. Wu Z, Zhao Y, Yu F, Shi H, Li J. Qigefang Inhibits Migration, Invasion, and Metastasis of ESCC by Inhibiting Gas6/Axl Signaling Pathway. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2021 May 22;16(2):285–94.
101. Han J, Tian R, Yong B, Luo C, Tan P, Shen J, et al. Gas6/Axl mediates tumor cell apoptosis, migration and invasion and predicts the clinical outcome of osteosarcoma patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;435(3):493–500.
102. Tai KY, Shieh YS, Lee CS, Shiah SG, Wu CW. Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF- κ B and Brg-1. *Oncogene*. 2008;27(29):4044–55.
103. Nalwoga H, Ahmed L, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA. Strong expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is associated with Axl expression and features of aggressive tumors in African breast cancer. *PLoS ONE*. 2016;11(1):1–17.
104. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, et al. Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(37):13373–8.
105. Morizono K, Xie Y, Olafsen T, Lee B, Dasgupta A, Wu AM, et al. The Soluble serum protein gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry. *Cell Host and Microbe*. 2011;9(4):286–98.
106. Fedeli C, Torriani G, Galan-Navarro C, Moraz ML, Moreno H, Gerold G, et al. Axl Can Serve as Entry Factor for Lassa Virus Depending on the Functional Glycosylation of Dystroglycan. *Journal of Virology*. 2018;92(5):1–22.
107. Shimojima M, Ikeda Y, Kawaoka Y. The mechanism of Axl-mediated ebola virus infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(SUPPL. 2):4–6.
108. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Guivel-benhassine F, Lew E, Lemke G, et al. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors. *Cell Host Microbe*. 2012;12(4):544–57.
109. Chen J, Yang YF, Yang Y, Zou P, Chen J, He Y, et al. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nature Microbiology*. 2018;3(3):302–9.
110. Song DH, Garcia G, Situ K, Chua BA, Hong MLO, Do EA, et al. Development of a blocker of the universal phosphatidylserine- and phosphatidylethanolamine-dependent viral entry pathways. *Virology*. 2021;560:17–33.
111. Alimonti JB, Ribecco-Lutkiewicz M, Sodja C, Jezierski A, Stanimirovic DB, Liu Q, et al. Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2018;15(1):1–9.
112. Wang ZY, Wang PG, An J. The Multifaceted Roles of TAM Receptors during Viral Infection. *Virol Sin*. 2021;36(1):1–12.
113. Kumar A, Jovel J, Lopez-Orozco J, Limonta D, Airo AM, Hou S, et al. Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–11.
114. Hastings AK, Yockey LJ, Jagger BW, Hwang J, Uraki R, Gaitsch HF, et al. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Reports*. 2017;19(3):558–68.
115. Tutusaus A, Marí M, Ortiz-Pérez JT, Nicolaes GAF, Morales A, García de Frutos P. Role of Vitamin K-Dependent Factors Protein S and GAS6 and TAM Receptors in SARS-CoV-2 Infection and COVID-19-Associated Immunothrombosis. *Cells*. 2020;9(10):1–15.

116. Dreytmueller D, Martin C, Kogel T, Pruessmeyer J, Hess FM, Horiuchi K, et al. Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide. *EMBO Molecular Medicine*. 2012;4(5):412–23.
117. Stone A V, Vanderman KS, Willey JS, David L, Register TC, Shively CA, et al. Heightened cleavage of Axl receptor tyrosine kinase by ADAM metalloproteases may contribute to disease pathogenesis in SLE. *Clin Immunol*. 2016;169:58–68.
118. Miller MA, Sullivan RJ, Lauffenburger DA. Molecular pathways: Receptor ectodomain shedding in treatment, resistance, and monitoring of cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(3):623–9.
119. Lee IJ, Hilliard BA, Ulas M, Yu D, Vangala C, Rao S, et al. Monocyte and plasma expression of TAM ligand and receptor in renal failure: Links to unregulated immunity and chronic inflammation. *Clinical Immunology*. 2015 Jun 1;158(2):231–41.
120. Li M, Xue W, Li X, Song Y, Liu X, Qin L. Axl is related to inflammation in hemodialysis patients. *Molecular Immunology*. 2021;133(February):146–53.
121. Bellan M, Quaglia M, Nerviani A, Mauro D, Lewis M, Goegan F, et al. Increased plasma levels of Gas6 and its soluble tyrosine kinase receptors Mer and Axl are associated with immunological activity and severity of lupus nephritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2021;39(1):132–8.
122. Ekman C, Linder A, Åkesson P, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Critical Care*. 2010;14(4).
123. Ekman C, Linder A, Åkesson P, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care*. 2010;14(4):R158.
124. Zhen Y, McGaha TL, Finkelman FD, Shao WH. The Akt-mTORC1 pathway mediates Axl receptor tyrosine kinase-induced mesangial cell proliferation. *J Leukoc Biol*. 2022 Mar;111(3):563–71.
125. Weinger JG, Omari KM, Marsden K, Raine CS, Shafit-Zagardo B. Up-regulation of soluble Axl and Mer receptor tyrosine kinases negatively correlates with Gas6 in established multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*. 2009;175(1):283–93.
126. Bellan M, Pirisi M, Sainaghi P. The Gas6/TAM System and Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):1807.
127. Ekman C, Stenhoff J, Dahlbäck B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(4):838–44.
128. Hyde GD, Taylor RF, Ashton N, Borland SJ, Wu HSG, Gilmore AP, et al. Axl tyrosine kinase protects against tubulo-interstitial apoptosis and progression of renal failure in a murine model of chronic kidney disease and hyperphosphataemia. *PLoS ONE*. 2014;9(7):1–11.
129. Yanagita M. Gas6, warfarin, and kidney diseases. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2004;8(4):304–9.
130. Batlle M, Recarte-Pelz P, Roig E, Castel MAA, Cardona M, Farrero M, et al. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *International Journal of Cardiology*. 2014;173(3):402–9.

131. Yang PW, Liu YC, Chang YH, Lin CC, Huang PM, Hua KT, et al. Cabozantinib (XL184) and R428 (BGB324) Inhibit the Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC). *Frontiers in Oncology*. 2019;9(November):1–12.
132. Ben-Batalla I, Erdmann R, Jørgensen H, Mitchell R, Ernst T, Von Amsberg G, et al. Axl blockade by BGB324 inhibits BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor-sensitive and -resistant chronic myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(9):2289–300.
133. Hoel A, Osman T, Hoel F, Elsaid H, Chen T, Landolt L, et al. Axl-inhibitor bemcentinib alleviates mitochondrial dysfunction in the unilateral ureter obstruction murine model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2021;25(15):7407–17.
134. Yang DC, Gu S, Li JM, Hsu SW, Chen SJ, Chang WH, et al. Targeting the AXL receptor in combating smoking-related pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2021;64(6):734–46.
135. Espindola MS, Habel DM, Narayanan R, Jones I, Coelho AL, Murray LA, et al. Targeting of TAM receptors ameliorates fibrotic mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2018;197(11):1443–56.
136. Smirne C, Rigamonti C, de Benedittis C, Sainaghi PP, Bellan M, Burlone ME, et al. Gas6/TAM Signaling Components as Novel Biomarkers of Liver Fibrosis. *Disease Markers*. 2019;2019:1–15.
137. Kurata A, Tachibana Y, Takahashi T, Horiba N. Novel AXL-specific inhibitor ameliorates kidney dysfunction through the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition of renal tubular cells. *PLoS ONE*. 2020;15(4):1–15.
138. M. Pahor, Manini and MC. Therapeutic efficacy of Tyro3, Axl, and MerTK agonists in collagen-induced arthritis. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
139. Bohan D, van Ert H, Ruggio N, Rogers KJ, Badreddine M, Aguilar Briseño JA, et al. Phosphatidylserine receptors enhance SARS-CoV-2 infection. *PLoS Pathog*. 2021;17(11):e100974.
140. Sheridan C. First Axl inhibitor enters clinical trials. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):775–6.
141. Choy G, Joshi-Hangal R, Oganessian A, Fine G, Rasmussen S, Collier J, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of amuvatinib from three phase 1 clinical studies in healthy volunteers. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2012;70(1):183–90.
142. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017 Oct 1;94:317–25.
143. Quirico L, Orso F, Esposito CL, Bertone S, Coppo R, Conti L, et al. Axl-148b chimeric aptamers inhibit breast cancer and melanoma progression. *International Journal of Biological Sciences*. 2020;16(7):1238–51.
144. Cerchia L, Esposito CL, Camorani S, Rienzo A, Stasio L, Insabato L, et al. Targeting Axl with an high-affinity inhibitory aptamer. *Molecular Therapy*. 2012;20(12):2291–303.
145. Tshiperson V, Li X, Schwartz GJ, Raine CS, Shafit-Zagardo B. GAS6 enhances repair following cuprizone-induced demyelination. *PLoS ONE*. 2010;5(12):1–9.

146. Ye X, Li Y, Stawicki S, Couto S, Eastham-Anderson J, Kallop D, et al. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene*. 2010;29(38):5254–64.
147. Zhao Z, Li Y, Liu W, Li X. Engineered IL-7 Receptor Enhances the Therapeutic Effect of AXL-CAR-T Cells on Triple-Negative Breast Cancer. *BioMed Research International*. 2020;2020.
148. Wei J, Sun H, Zhang A, Wu X, Li Y, Liu J, et al. A novel AXL chimeric antigen receptor endows T cells with anti-tumor effects against triple negative breast cancers. *Cellular Immunology*. 2018;331(April):49–58.
149. Cho JH, Okuma A, Al-Rubaye D, Intisar E, Junghans RP, Wong WW. Engineering Axl specific CAR and SynNotch receptor for cancer therapy. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–8.
150. Kang CH, Kim Y, Lee SM, Choi SU, Park CH. Development of Antigen-specific Chimeric Antigen Receptor KHYG-1 Cells for Glioblastoma. *Anticancer Research*. 2021 Apr 1;41(4):1811–9.
151. Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Research*. 2010;70(4):1544–54.
152. Zdzalik-Bielecka D, Kozik K, Poświata A, Jastrzębski K, Jakubik M, Międzyńska M. Bemcentinib and Gilteritinib Inhibit Cell Growth and Impair the Endo-Lysosomal and Autophagy Systems in an AXL-Independent Manner. *Molecular Cancer Research*. 2021;28–30.
153. Mori M, Kaneko N, Ueno Y, Yamada M, Tanaka R, Saito R, et al. Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Investigational New Drugs*. 2017;35(5):556–65.
154. Sun L, Liang C, Shirazian S, Zhou Y, Miller T, Cui J, et al. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2, 4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosin. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003;46(7):1116–9.
155. Debaillon Vesque A, Decraecker M, Blanc JF. Profile of Cabozantinib for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: Patient Selection and Special Considerations. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. 2020;7:91–9.
156. Konicek BW, Capen AR, Credille KM, Ebert PJ, Falcon BL, Heady GL, et al. Merestinib (LY2801653) inhibits neurotrophic receptor kinase (NTRK) and suppresses growth of NTRK fusion bearing tumors. *Oncotarget*. 2018;9(17):13796–806.
157. Saleh M, Cassier PA, Eberst L, Naik G, Morris VK, Pant S, et al. Phase I Study of Ramucirumab Plus Merestinib in Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer: Safety, Preliminary Efficacy, and Pharmacokinetic Findings. *The Oncologist*. 2020;25(11):e1628–39.
158. Myers SH, Temps C, Houston DR, Brunton VG, Unciti-Broceta A. Development of Potent Inhibitors of Receptor Tyrosine Kinases by Ligand-Based Drug Design and Target-Biased Phenotypic Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;61(5):2104–10.
159. Fleuren EDG, Hillebrandt-Roeffen MHS, Flucke UE, te Loo DMWM, Boerman OC, van der Graaf WTA, et al. The role of AXL and the in vitro activity of the receptor tyrosine kinase inhibitor BGB324 in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2014;5(24):12753–68.

160. A. Melnick L, Sheng MC. AXL is a logical molecular target in head and neck squamous cell carcinoma. *Physiol Behav.* 2016;176(1):100–106.
161. Malinova A, Veghini L, Real FX, Corbo V. Cell Lineage Infidelity in PDAC Progression and Therapy Resistance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2021;9(December):1–19.
162. Javadrashid D, Baghbanzadeh A, Derakhshani A, Leone P, Silvestris N, Racanelli V, et al. Pancreatic cancer signaling pathways, genetic alterations, and tumor microenvironment: The barriers affecting the method of treatment. *Biomedicines.* 2021;9(4).
163. Wanebo HJ, Vezeridis MP. Pancreatic cancer: An overview. *Seminars in Surgical Oncology.* 1995;11(2):168–80.
164. Goral V. Pancreatic cancer: Pathogenesis and diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2015;16(14):5619–24.
165. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology.* 2016;22(44):9694–705.
166. Benzel J, Fendrich V. Familial Pancreatic Cancer. *Oncology Research and Treatment.* 2018 Oct 1;41(10):611–8.
167. Wolpin BM. Pancreatic Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 2015 Aug 1;29(4):xiii–xiv.
168. Kartal E, Schmidt TSB, Molina-Montes E, Rodríguez-Perales S, Wirbel J, Maistrenko OM, et al. A faecal microbiota signature with high specificity for pancreatic cancer. *Gut.* 2022;1–14.
169. Gupta R, Amanam I, Chung V. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology.* 2017;116(1):25–34.
170. Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Löhner JM, Neoptolemos J, et al. Addressing the challenges of pancreatic cancer: Future directions for improving outcomes. *Pancreatology.* 2015;15(1):8–18.
171. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (1979).* 2008;321(5897):1801–6.
172. Digiacomo G, Volta F, Garajova I, Balsano R, Cavazzoni A. Biological hallmarks and new therapeutic approaches for the treatment of pdac. *Life.* 2021;11(8):1–14.
173. The Cancer Genome Atlas Research Network, Raphael BJ. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma The Cancer Genome Atlas Research Network *. *Cancer Cell.* 2017;32(2)(2).
174. Amin M, An E, Ayad C, Bauer T, Birger C, Birrer MJ, et al. Proteogenomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. 2021;184(19):5031–52.
175. Kim JY, Hong SM. Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Oncology Research and Treatment.* 2018 Oct 1;41(10):603–10.
176. Singhi AD, Maitra A. The Molecular Pathology of Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Pancreatic Cancer.* 2018 Apr 11;147–76.
177. Connor AA, Gallinger S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. *Nature Reviews Cancer* 2021 22:3. 2021 Nov 17;22(3):131–42.

178. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016;531(7592):47–52.
179. Loeza H, Hoadley KA, Rashid NU, Williams LA. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Genetics*. 2016;47(10):1168–78.
180. Jack Jr, C.R., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J. and Liu E. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Alzheimer's & Dementia*. 2018;14(4):535–62.
181. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Gu S, Cooc J, et al. Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nat med*. 2011;17(4):500–3.
182. Tatarian T, Winter JM. Genetics of Pancreatic Cancer and Its Implications on Therapy. *Surgical Clinics of North America*. 2016 Dec 1;96(6):1207–21.
183. Preis M, Korc M. Signaling pathways in pancreatic cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2011;21(2):115–29.
184. Bernal Astrain G, Nikolova M, Smith MJ. Functional diversity in the RAS subfamily of small GTPases. *Biochem Soc Trans*. 2022 Apr 29;50(2):921–33.
185. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):1–20.
186. Zhao Y, Schoeps B, Yao D, Zhang Z, Schuck K, Tissen V, et al. mTORC1 and mTORC2 Converge on the Arp2/3 Complex to Promote KrasG12D-Induced Acinar-to-Ductal Metaplasia and Early Pancreatic Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2021 Apr 1;160(5):1755-1770.e17.
187. Zhou T, Liu J, Xie Y, Yuan S, Guo Y, Bai W, et al. ESE3/EHF, a promising target of rosiglitazone, suppresses pancreatic cancer stemness by downregulating CXCR4. *Gut*. 2022 Feb 1;71(2):357–71.
188. Shields MA, Spaulding C, Metropulos AE, Khalafalla MG, Pham TND, Munshi HG. Gα13 loss in Kras/Tp53 mouse model of pancreatic tumorigenesis promotes tumors susceptible to rapamycin. *Cell Rep*. 2022 Mar;38(9):110441.
189. Mahajan UM, Li Q, Alnatsha A, Maas J, Orth M, Maier SH, et al. Tumor-Specific Delivery of 5-Fluorouracil–Incorporated Epidermal Growth Factor Receptor–Targeted Aptamers as an Efficient Treatment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Models. *Gastroenterology*. 2021;161(3):996-1010.e1.
190. Wang H, Song X, Weng H, Logsdon CD, Rashid A, Fleming JB, et al. Overexpression of Receptor Tyrosine Kinase Axl Promotes Tumor Cell Invasion and Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer*. 2011 Feb 15;117(4):734.
191. Ottenhof NA, Morsink FHM, Kate F Ten, Van Noorden CJF, Offerhaus GJA. Multivariate analysis of immunohistochemical evaluation of protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma reveals prognostic significance for persistent Smad4 expression only. *Cellular Oncology*. 2012;35(2):119–26.
192. Leconet W, Larbouret C, Chardès T, Thomas G, Neiveyans M, Busson M, et al. Preclinical validation of AXL receptor as a target for antibody-based pancreatic cancer immunotherapy. *Oncogene*. 2014 Nov 20;33(47):5405–14.

193. Kirane A, Ludwig KF, Sorrelle N, Haaland G, Sandal T, Ranaweera R, et al. Warfarin Blocks Gas6-Mediated Axl Activation Required for Pancreatic Cancer Epithelial Plasticity and Metastasis. *Cancer Res.* 2015 Sep 15;75(18):3699–705.
194. Du W, Phinney NZ, Huang H, Wang Z, Westcott J, Toombs JE, et al. AXL Is a Key Factor for Cell Plasticity and Promotes Metastasis in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Research.* 2021 Apr 2;
195. Ireland L, Lockett T, Schmid MC, Mielgo A. Blockade of Stromal Gas6 Alters Cancer Cell Plasticity, Activates NK Cells, and Inhibits Pancreatic Cancer Metastasis. *Frontiers in Immunology.* 2020 Feb 27;11(February):1–16.
196. Zhang Y, Arner EN, Rizvi A, Toombs JE, Huang H, Warner SL, et al. AXL Inhibitor TP-0903 Reduces Metastasis and Therapy Resistance in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2022;21(1):38–47.
197. Son HY, Jeong HK. Immune Evasion Mechanism and AXL. *Frontiers in Oncology.* 2021;11(October):756225.
198. Peck KM, Lauring AS. Complexities of Viral Mutation Rates. *Journal of Virology.* 2018;92(14):1–8.
199. Forchette L, Sebastian W, Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Current Medical Science.* 2021;41(6):1037–51.
200. Yesudhas D, Srivastava A, Gromiha MM. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection.* 2021;49(2):199–213.
201. Millet JK, Jaimes JA, Whittaker GR. Molecular diversity of coronavirus host cell entry receptors. *FEMS Microbiology Reviews.* 2021;45(3):1–16.
202. Mouffak S, Shubbar Q, Saleh E, El-awady R. Recent advances in management of COVID-19: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2021;143(January).
203. Alsharif W, Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Department of Diagnostic Radiology Technology, Faculty of Applied Medical Sciences.* 2020;(January).
204. Hoque MN, Akter S, Mishu ID, Islam MR, Rahman MS, Akhter M, et al. Microbial co-infections in COVID-19: Associated microbiota and underlying mechanisms of pathogenesis. *Microbial Pathogenesis.* 2021;156(January).
205. Shibata T, Makino A, Ogata R, Nakamura S, Ito T, Nagata K, et al. Respiratory syncytial virus infection exacerbates pneumococcal pneumonia via Gas6/Axl-mediated macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation.* 2020;130(6):3021–37.
206. Montani D, Savale L, Noel N, Meyrignac O, Colle R, Gasnier M, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Eur Respir Rev.* 2022;31(163):601–15.
207. Cao Y, Yang R, Lee I, Zhang W, Sun J, Wang W, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Science.* 2021;30(6):1114–30.
208. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727–33.
209. Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol.* 2020 Nov 1;85.
210. Wu YC, Chen CS, Chan YJ. The outbreak of COVID-19: An overview. *Journal of the Chinese Medical Association.* 2020;83(3):217–20.

211. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022;23(1):3–20.
212. Ke Z, Oton J, Qu K, Cortese M, Zila V, McKeane L, et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*. 2020 Dec 17;588(7838):498–502.
213. Wang H, Yang P, Liu K, Guo F, Zhang Y, Zhang G, et al. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Research*. 2008;18(2):290–301.
214. Yang N, Shen HM. Targeting the endocytic pathway and autophagy process as a novel therapeutic strategy in COVID-19. *International Journal of Biological Sciences*. 2020;16(10):1724–31.
215. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circulation Research*. 2020;1456–74.
216. Patel VB, Clarke N, Wang Z, Fan D, Parajuli N, Basu R, et al. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Jan;66:167–76.
217. Palacios Y, Ruiz A, Ramón-Luing LA, Ocaña-Guzman R, Barreto-Rodriguez O, Sánchez-Monciváis A, et al. Severe COVID-19 patients show an increase in soluble TNFR1 and ADAM17, with a relationship to mortality. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. p. 8423.
218. Yang L, Xie X, Tu Z, Fu J, Xu D, Zhou Y. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):1–20.
219. Grau-Expósito J, Perea D, Suppi M, Massana N, Vergara A, Soler MJ, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 entry, inflammation and new therapeutics in human lung tissue cells. *PLoS Pathogens*. 2022;18(1):1–27.
220. Stewart CA, Gay CM, Ramkumar K, Cargill KR, Cardnell RJ, Nilsson MB, et al. Lung Cancer Models Reveal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Coronavirus Disease 2019 Pathophysiology. *J Thorac Oncol*. 2021;16(11):1821–39.
221. Chen CH, Chen HC, Chang CC, Peng YJ, Lee CH, Shieh YS, et al. Growth Arrest-Specific 6 Protein in Patients with Sjögren Syndrome: Determination of the Plasma Level and Expression in the Labial Salivary Gland. *PLOS ONE*. 2015 Oct 7;10(10):e0139955.
222. McShane L, Tabas I, Lemke G, Kurowska-Stolarska M, Maffia P. TAM receptors in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2019;115:1286–95.
223. Bellan M, Cittone MG, Tonello S, Rigamonti C, Castello LM, Gavelli F, et al. Gas6/TAM system: A key modulator of the interplay between inflammation and fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(20):5070.
224. Caldentey G, García De Frutos P, Cristóbal H, Garabito M, Berruezo A, Bosch X, et al. Serum levels of Growth Arrest-Specific 6 protein and soluble AXL in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2019 Dec;8(8):708–16.
225. Batlle M, Recarte-Pelz P, Roig E, Castel MA, Cardona M, Farrero M, et al. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *International Journal of Cardiology*. 2014 May;173(3):402–9.

226. Recarte-Pelz P, Tàssies D, Espinosa G, Hurtado B, Sala N, Cervera R, et al. Vitamin K-dependent proteins GAS6 and Protein S and TAM receptors in patients of systemic lupus erythematosus: correlation with common genetic variants and disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2013 Mar 12;15(2):R41.
227. Gong S, Xu Z, Liu Y, Xing L, Ma J, Yu C, et al. Plasma sMer, sAxl and GAS6 levels correlate with disease activity and severity in lupus nephritis. *European Journal of Clinical Investigation*. 2019 Mar 1;49(3):e13064.
228. Bassyouni IH, El-wakd MM, Azab NA, Bassyouni RH. Diminished soluble levels of growth arrest specific protein 6 and tyrosine kinase receptor Axl in patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2014;1–7.
229. Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Molinari R, Sola D, Ranza E, et al. Growth arrest specific gene 6 protein concentration in cerebrospinal fluid correlates with relapse severity in multiple sclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:406483.
230. Bárcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, Joannas L, Menéndez A, García-Ruiz C, et al. Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *Journal of Hepatology*. 2015 Sep;63(3):670–8.
231. Hu W, Zheng C, Quan R, Dai X, Zhang X. The Prognostic Value of Combination of Plasma Fibrinogen and CA19-9 in Non-Distant Metastatic Breast Cancer Patients Undergoing Surgery. *Cancer Manag Res*. 2020;12:8875–86.
232. Murali Manohar K, Sasikala M, Yesaswini KVSRR, Sunil V, Talukdar R, Murthy HVV, et al. Plasma microRNA192 in combination with serum CA19-9 as non-invasive prognostic biomarker in periampullary carcinoma. *Tumour Biol*. 2017 Mar 1;39(3):1.
233. Pesta M, Kucera R, Topolcan O, Karlikova M, Houfkova K, Polivka J, et al. Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 1;11(6):864.
234. Koorstra JBM, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S, Rojas PL, Offerhaus GJA, et al. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther*. 2009 Apr 1;8(7):618.
235. Martinez-Bosch N, Barranco LE, Orozco CA, Moreno M, Visa L, Iglesias M, et al. Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker. *Oncotarget*. 2018 Aug 31;9(68):32984.
236. Ischenko I, D'Amico S, Rao M, Li J, Hayman MJ, Powers S, et al. KRAS drives immune evasion in a genetic model of pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1):1482.
237. Sandgren EP, Quaife CJ, Paulovich AG, Palmiter RD, Brinster RL. Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jan 1;88(1):93–7.
238. Gustafsson A, Martuszewska D, Johansson M, Ekman C, Hafizi S, Ljungberg B, et al. Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 15;15(14):4742–9.
239. Ekman C, Jönsen A, Sturfelt G, Bengtsson AA, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 and sAxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Jun 1;50(6):1064–9.

240. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. Biomarkers for pancreatic cancer: Promising new markers and options beyond CA 19-9. *Tumor Biology*. 2013;34(6):3279–92.
241. Zhang Y, Yang J, Li H, Wu Y, Zhang H, Chen W. Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015 Jul 30;8(7):11683.
242. de Bruin S, Bos LD, van Roon MA, Tuij-de Boer AM, Schuurman AR, Koel-Simmelinck MJA, et al. Clinical features and prognostic factors in Covid-19: A prospective cohort study. *EBioMedicine*. 2021 May 1;67:103378.
243. Huckriede J, Anderberg SB, Morales A, de Vries F, Hultström M, Bergqvist A, et al. Evolution of NETosis markers and DAMPs have prognostic value in critically ill COVID-19 patients. *Scientific Reports* 2021 11:1. 2021 Aug 3;11(1):1–12.
244. Xie S, Zhang H, Liang Z, Yang X, Cao R. AXL, an Important Host Factor for DENV and ZIKV Replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021 Mar 22;11:167.