



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

(MENCION DOCTORADO INTERNACIONAL)

Análisis proteómico durante el desarrollo de la pancreatitis aguda experimental

Violeta García Hernández

Salamanca, 2017



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Campus Miguel de Unamuno - Edificio Departamental

Pza. Doctores de la Reina s/n 37007 Salamanca. Spain.

Tel.+34-923 294 465 Fax:+34-923 294 579



El Dr. JESÚS SÁNCHEZ YAGÜE y la DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ BERNAL,
Profesores Titulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad
de Biología de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada ***“Análisis proteómico durante el desarrollo de la pancreatitis aguda experimental”***, que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta la Licenciada Dña. Violeta García Hernández, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que la Tesis Doctoral se halla concluida, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Salamanca a seis de julio de dos mil diecisiete.

Fdo.: M^a Carmen Sánchez Bernal

Fdo.: Jesús Sánchez Yagüe



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Campus Miguel de Unamuno - Edificio Departamental

Pza. Doctores de la Reina s/n 37007 Salamanca. Spain.

Tel.+34-923 294 465 Fax:+34-923 294 579



VIOLETA GARCÍA HERNÁNDEZ, Licenciada en Biología por la Universidad de Salamanca,

DECLARO:

Que soy la Autora de esta Tesis Doctoral titulada **“Análisis proteómico durante el desarrollo de la pancreatitis aguda experimental”**, realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca bajo la dirección de los Drs. D. Jesús Sánchez Yagüe y Dña. M^a del Carmen Sánchez Bernal.

Y para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca a seis de julio de dos mil diecisiete.

Fdo.: Violeta García Hernández

NOTA PRELIMINAR

1. FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido financiado con cargo a los proyectos subvencionados por el Instituto de Salud Carlos III (FEDER–FIS, PI09/1075 y PI15/01156), la Junta de Castilla y León (SA005A10-2, Biomedicina BIO 103/SA39/11) y la Universidad de Salamanca (18KAFG/463AC01).

La autora de la presente Memoria ha disfrutado de una ayuda para la Formación del Personal Universitario (FPU), del Ministerio Español de Educación, Cultura y Deporte (FPU2010-2350). Durante su estancia en Ginebra (Suiza), la autora fue beneficiaria de una ayuda de la European Molecular Biology Organization (EMBO-Short term fellowship (ASTF523-2014)).

2. PUBLICACIONES

Los resultados recogidos en esta Memoria han sido en parte publicados en los siguientes artículos:

García-Hernández, V., Sánchez-Bernal, C., Sarmiento, N., Viana, R. A., Ferreira, L., Pérez, N., Calvo, J. J. and Sánchez-Yagüe, J. (2012). Proteomic analysis of the soluble and the lysosomal+mitochondrial fractions from rat pancreas: Implications for cerulein-induced acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 1058–1067.

García-Hernández, V., Sarmiento, N., Sánchez-Bernal, C., Matellán, L., Calvo, J. J. and Sánchez-Yagüe, J. (2014). Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due

to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 192–201.

García-Hernández, V., Sarmiento, N., Sánchez-Bernal, C., Coveñas, R., Hernández-Hernández, A., Calvo, J. J. and Sánchez-Yagüe, J. (2016). Changes in the expression of LIMP-2 during cerulein-induced pancreatitis in rats: Effect of inhibition of leukocyte infiltration, cAMP and MAPKs early on in its development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 72, 109–117.

Asimismo, este trabajo de investigación ha dado lugar a la redacción de un cuarto artículo, titulado “A Tandem Mass Tag (TMT) proteomic analysis during the early phase of experimental pancreatitis reveals new insights in the disease pathogenesis” que ha sido enviado a la revista *Journal of Proteome Research*.

3. OBTENCIÓN DE LA MENCIÓN DE DOCTORADO INTERNACIONAL

En la presente Memoria se incluye un resumen (apartado *Summary*) y las conclusiones en inglés para optar a la mención de Doctorado Internacional.

Abreviaturas

ACRÓNIMOS y ABREVIATURAS

2-DE: *two dimensional electrophoresis*, electroforesis bidimensional.

2D-PAGE: *two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida.

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia.

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico.

APS: *ammonium persulfate*, persulfato amónico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

CCK: colecistoquinina.

Cer: ceruleína.

CHAPS: *3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonium]-1-propanesulfonate*, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato.

CPRE: colangiopancreatografía retrógrada endoscópica.

DIGE: *differential in gel electrophoresis*, electroforesis diferencial en gel.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DTT: *dithithreitol*, ditiotreitól.

EDTA: *ethylenediaminetetracetic acid*, ácido etilendiaminotetracético.

ERK: *extracellular regulated kinase*, quinasa regulada por señales extracelulares.

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

HPLC: *high pressure liqyuid chromatography*, cromatografía líquida de alta presión.

HRP: *horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano.

ICAT: *isotope-coded affinity tag*, etiqueta de afinidad codificada por isótopo.

IEF: *isoelectrofocusing*, enfoque isoeléctrico o isoelectroenfoco.

IPG: *immobilized pH gradient*, gradiente inmovilizado de pH.

JAKs: *Janus kinases*, quinasas de la familia "Janus".

JNK: *Jun N-kinase*, quinasa c-Jun N-terminal.

L+M: Fracción de lisosomas y mitocondrias.

LAMP: *lysosome associated membrane protein*, proteína asociada a la membrana del lisosoma.

LC: *liquid chromatography*, cromatografía líquida.

LIMP: *lysosome integral membrane protein*, proteína integral de la membrana del lisosoma.

MALDI: *matrix-assisted laser desorption/ionization*, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz.

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*, proteína quinasa activada por mitógeno.

MPO: mieloperoxidasa.

M_r: masa molecular relativa.

MS: *mass spectrometry*, espectrometría de masas.

MS/MS: espectrometría de masas en tándem.

NF-κB: *nuclear factor*, factor nuclear kappa B.

PA: pancreatitis aguda.

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida.

pb: pares de bases.

PBS: *phosphate buffer solution*, disolución amortiguadora salina de fosfato.

pi: punto isoeléctrico.

PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*, fenilmetil-sulfonil fluoruro.

PTK: *phosphatase tyrosine kinase*, proteína tirosina quinasa.

PTP: *protein tyrosine phosphatase*, proteína tirosina fosfatasa.

PVDF: *polyvinylidene difluoride*, difluoruro de polivinilideno.

RE: retículo endoplasmático.

ROS: *reactive oxygen species*, especies reactivas del oxígeno.

RT-PCR: *reverse transcription coupled to polymerase chain reaction*, transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.

SDS: *sodium dodecyl sulphate*, dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

SHP: *Src Homology2 protein*, proteína con dominios SH2 (homólogos al dominio 2 de la proteína Src).

SNP: *sodium nitroprusside*, nitroprusiato sódico.

STATs: *signals transducer activating transcription*, proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción.

TBS: *tris buffer solution*, disolución amortiguadora salina de Tris.

TCA: *trichloroacetic acid*, ácido tricloroacético.

TEMED: *NNN'N'-tetramethylethylenediamine*, N'N'N'N'-tetrametiletildiamina.

TMT: *tandem mass tag*, etiqueta de masa en tándem.

TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*, factor de necrosis tumoral alfa.

TOF: *time of flight*, tiempo de vuelo.

Tris: *tris (hydroxymethyl) aminomethane*, tris(hidroximetil)aminometano.

Tween 20: *polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate*, Polioxietileno 20 sorbitan monolaurato.

U: unidades enzimáticas.

v/v: volumen/volumen.

Vh: *voltios-hora*, voltaje acumulado.

w/v: *weight/ volume*, peso/volumen.

ÍNDICE

I. Introducción	1
1. El páncreas.....	3
1.1. Pancreatitis aguda	5
1.1.1. Etiología e incidencia	5
1.1.2. Clasificación	6
1.1.3. Mecanismos fisiopatológicos.....	6
1.2. Pancreatitis aguda experimental	8
1.2.1. Modelos animales.....	8
1.2.2. Pancreatitis aguda inducida por hiperestimulación con ceruleína	8
1.3. Fase temprana de la pancreatitis aguda	9
2. Lisosomas.....	10
2.1. Proteínas de la membrana lisosómica	11
2.2. Lisosomas y pancreatitis.....	13
3. Fosforilación en tirosina. Proteína tirosina fosfatasa.....	15
3.1. Clasificación de las proteína tirosina fosfatasa.	17
3.2. . Dominio catalítico de las proteína tirosina fosfatasa	18
3.3. Regulación de las proteínas tirosina fosfatasa en la pancreatitis aguda	20
3.4. Papel de las proteína tirosina fosfatasa en la pancreatitis aguda	21
4. Proteómica	22
4.1. Concepto	22
4.2. Técnicas de prefraccionamiento en proteómica.....	23
4.3. Técnica proteómica 2D-PAGE.....	24
4.4. Espectrometría de masas	25
4.5. Técnica proteómica TMT.....	26
4.6. Fosfoproteómica	27
4.7. Proteómica del páncreas.....	28
4.7.1. Estudio del proteoma del páncreas en la pancreatitis aguda	29

II.Objetivos..... 33**III.Materiales y Métodos..... 37**

1.Material	39
1.1. Material	39
1.2. Material informático	39
1.3. Medios instrumentales	39
1.4. Reactivos	41
1.5. Animales de experimentación.....	41
1.5.1. Grupos experimentales	
2.Métodos	42
2.1.Inducción de la pancreatitis aguda: modelo por hiperestimulación con ceruleína.....	42
2.2. Tratamientos	44
2.2.1. Inhibición de JNK y ERK1/2 por SP600125 y PD98059	
2.2.2. Inhibición de la fosfodiesterasa tipo IV por rolipram	
2.2.3. Inhibición de células inflamatorias	
2.3. Resumen de los grupos experimentales ensayados	46
2.4. Recogida de las muestras de sangre y de páncreas.....	47
2.5. Aislamiento de las fracciones subcelulares del páncreas	47
2.5.1. Aislamiento de orgánulos subcelulares (esquema 4)	
2.5.2. Aislamiento de las fracciones soluble y de membranas totales	
2.6. Valoración histológica del pancreas.....	51
2.7. RT-PCR semicuantitativa	51
2.7.1. Obtención del ARN.....	52
2.7.2. Síntesis del ADN copia (ADNc) y reacción de PCR.....	52
2.8. Electroforesis en gel de agarosa	53

2.9. Determinación de la concentración de proteínas.....	54
2.10. Determinación de actividades enzimática.....	54
2.10.1. Determinación de la actividad mieloperoxidásica	
2.10.2. Determinación de la actividad amilásica sérica	
2.11. Técnicas proteómicas.....	54
2.11.1. Electroforesis bidimensional (2-DE)	
2.11.2. Proteómica cuantitativa <i>shotgun</i> : Marcaje isobárico TMT combinado con LC-MS/MS	
2.11.3. Fosfoproteómica cuantitativa <i>shotgun</i> : marcado isobárico TMT con enriquecimiento de fosfopéptidos, combinado con LC-MS/MS	
2.12. Análisis de la expresión o fosforilación de proteínas mediante transferencia de Western.....	67
2.12.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	
2.12.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida Mn ²⁺ Phos-tag en presencia de SDS (Phos-tag SDS-PAGE)	
2.12.3. Transferencia de las proteínas a la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)	
2.12.4. Incubación de la membrana con los anticuerpos	
2.12.5. Detección	
2.13. Desfosforilación de proteínas con fosfatasa alcalina (ALP).....	72
2.14. Valoración de dianas proteicas en pacientes sometidos a CPRE.....	73
2.14.1. Población a estudio	
2.14.2. Recogida de las muestras	
2.14.3. Obtención y tratamiento de los plasmas	
2.15. . Análisis bioinformático.....	74
2.16. Análisis estadístico.....	74
IV. Resultados	77
1.Objetivo 1	81

2.Objetivo 2	102
3.Objetivo 3	118
4.Objetivos 4 y 5	158
5. Objetivo 6	175
6. Objetivo 7	208
V. Discusión.....	216
VI. Conclusiones.....	233
Conclusiones	235
2. Conclusions	237
VII. Bibliografía.....	239
Summary.....	257



I. Introducción

1. EL PÁNCREAS

El páncreas es un órgano glandular situado en el retroperitoneo izquierdo, en la zona posterior del abdomen, con función exocrina y endocrina. La secreción exocrina es el jugo pancreático y está involucrado en la digestión, mientras que la endocrina es fundamental para la regulación metabólica. La porción exocrina, junto con los vasos sanguíneos representa el 88% del volumen, la endocrina el 2%, mientras que el 10% restante corresponde al estroma. Anatómicamente se distinguen tres zonas: cabeza, cuerpo y cola (figura 1A).

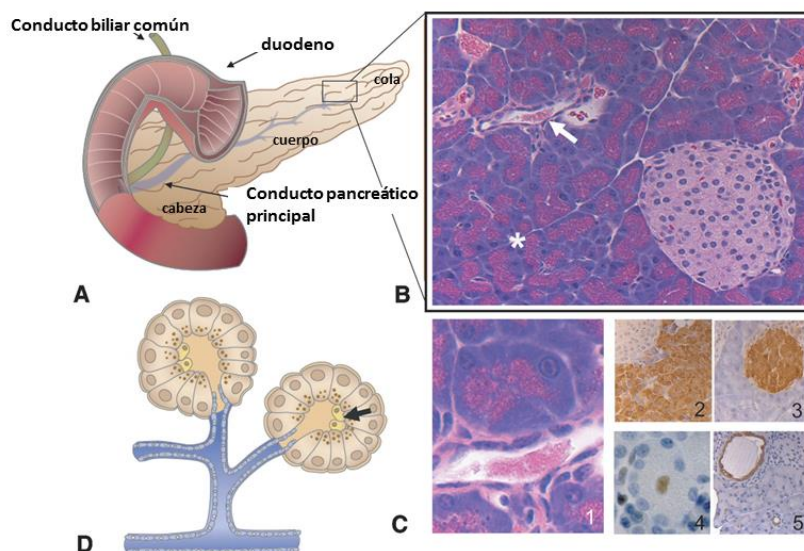


Figura 1. Anatomía del páncreas. **A)** Situación del páncreas respecto al duodeno y conducto pancreático común. **B)** Principales componentes del parénquima pancreático a nivel histológico; *abajo derecha*: islote de Langherans. El asterisco está colocado entre los acinos. La flecha indica los conductos. **C)** Fotomicrografías de secciones con tinción de H&E e inmunohistoquímica. (*Panel 1*) Unidad acinar en relación con el conducto. (*Panel 2*) Unidad acinar visualizada con un anticuerpo para amilasa. (*Panel 3*) Islote de Langherans visualizado con un anticuerpo para insulina. (*Panel 4*) Células centroacinares. (*Panel 5*) Células ductulares (vistas en corte transversal). **D)** Representación de una unidad acinar mostrando la relación con el conducto pancreático. La flecha indica las células centroacinares.

En el seno del tejido pancreático exocrino hay pequeñas porciones de tejido endocrino, denominados islotes de Langerhans (figura 1B), que son responsables de la secreción de insulina (células β), glucagón (células α), somatostatina (células δ) y polipéptido pancreático (células PP).

La parte exocrina del páncreas está constituida por tres tipos de células: acinares, centroacinares y ductulares. Las células acinares se organizan en agrupaciones denominadas acinos (figura 2B, C *panel 1* y D). Son células con una gran capacidad de síntesis proteica, que se concreta en la producción de enzimas digestivas, acumuladas en los gránulos de zimógeno de su zona apical. Las enzimas digestivas son de diversos tipos: proteolíticas, lipolíticas, glucolíticas y nucleolíticas y se secretan en forma de proenzimas, que sólo se activan al llegar al duodeno. Las células ductulares forman los conductos pancreáticos (figura 1C, *panel 1*), en cuyo origen se sitúan las células centroacinares y forman el árbol ductal. Las células ductulares (figura 2C, *panel 5*), son responsables de la secreción hidroelectrolítica, constituida básicamente por una solución acuosa rica en bicarbonato. La secreción acinar alcanza primeramente los conductos intercalares, los cuales se fusionan en los intralobulares, que, a su vez, desembocan en los interlobulares y finalmente, estos drenan en el conducto pancreático principal (figura 1A), que vierte al duodeno. El jugo pancreático está constituido por una solución acuosa de proenzimas pancreáticas, cuya activación se produce en la luz duodenal, siendo el bicarbonato imprescindible para neutralizar el contenido ácido procedente del estómago y facilitar, mediante el aumento del pH, la actuación de las enzimas digestivas ya activadas.

La secreción pancreática exocrina está sometida a un control neurohormonal, que responde al pH ácido del contenido duodenal y a la presencia de diversos productos de la digestión en duodeno. El nervio más importante en la regulación de la secreción pancreática exocrina es el nervio vago, que estimula sobre todo la secreción acinar, aunque también la ductal. En relación al control hormonal, las dos hormonas más importantes son la secretina, que estimula la secreción de bicarbonato y la colecistocinina (CCK) que estimula la secreción enzimática.

1.1. Pancreatitis aguda

La pancreatitis se define como una inflamación del tejido pancreático, acompañada de la destrucción total o parcial de la glándula. Se distinguen dos tipos de pancreatitis, la aguda, que en la mayoría de los casos es reversible y la crónica, que se caracteriza por ser progresiva.

La pancreatitis crónica es un síndrome fibro-inflamatorio debido a una serie de factores etiológicos. Esta patología está asociada a numerosas mutaciones genéticas y polimorfismos que predisponen a padecer esta enfermedad, con una variedad de agentes desencadenantes. Desde el punto de vista histológico se caracteriza por un aumento del tejido fibrótico acompañado de la pérdida de tejido acinar y endocrino (Gupte y Forsmark, 2014).

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad inflamatoria aguda, caracterizada clínicamente por un repentino dolor localizado en la parte superior del abdomen, acompañado de un aumento de las concentraciones plasmáticas de enzimas pancreáticas (amilasa y lipasa) (Isenmann y Beger, 1999).

Aunque la mayoría (80%) de las PAs son leves y se resuelven espontáneamente después de unos días con tratamiento conservador en el hospital, un porcentaje en torno al 20% desarrollan síntomas graves que pueden resultar fatales (Forsmark y Baillie, 2007). La patogénesis de la PA continúa siendo un enigma tanto para los investigadores básicos como para los clínicos y, sobre todo, no se sabe por qué en algunos casos la pancreatitis evoluciona hacia una forma grave, pudiendo desembocar en la muerte del paciente, y en otros se resuelve de manera más o menos espontánea, con tratamiento conservador.

1.1.1. Etiología e incidencia

El abuso de alcohol y la presencia de cálculos biliares son responsables de la mayoría de los casos de PA (aproximadamente un 80% de las PAs). Otras causas son el tabaco, causas genéticas, anomalías congénitas del páncreas, tumores que obstruyen

los conductos, la fibrosis quística o la manipulación del conducto pancreático en la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) (Lankisch *et al.*, 2015).

La incidencia de la PA ha ido aumentando en los últimos años, con un porcentaje de mortalidad total entre un 3-6 %, que asciende al 30% en los casos de PA grave (Roberts *et al.*, 2013). La PA fue la segunda causa más alta de estancia en el hospital y la quinta causa de muerte dentro de los hospitales, con un gasto sanitario en Estados Unidos de 2600 millones de dólares (Lankisch *et al.*, 2015). Por tanto, se puede considerar que la PA está asociada a una alta morbilidad, mortalidad y costes sanitarios.

1.1.2. Clasificación

La PA puede clasificarse en dos tipos:

Edematosa: Es la forma leve y cursa con edema intersticial, puede tener necrosis grasa, pero no parenquimatosa. De forma característica, se observa en las células acinares la presencia de abundantes vacuolas intracitoplásmicas, que contienen enzimas digestivas e hidrolasas lisosómicas.

Hemorrágica-necrotizante: Es la forma grave, caracterizada por la aparición de una serie de complicaciones en la glándula, como necrosis, pseudoquistes y abscesos pancreáticos. Esta pancreatitis puede cursar con fallo multiorgánico.

La clasificación de Atlanta (Lankisch *et al.*, 2015) considera la pancreatitis según su gravedad y la divide en: (i) *leve*, sin fallo orgánico, ni complicaciones locales o sistémicas; (ii) *moderadamente grave*, fallo orgánico transitorio (menos de 48 horas) y/o complicaciones locales o sistémicas, sin fallo orgánico persistente (más de 48 horas) y (iii) *grave*: fallo orgánico persistente (más de 48 horas) en un órgano o en varios.

1.1.3. Mecanismos fisiopatológicos

Fue Chiari (1896) el primero que propuso el concepto de autodigestión del páncreas debido a la activación de las enzimas pancreáticas (Chiari, 1896). Desde entonces se ha manejado la hipótesis de que la activación del tripsinógeno a tripsina era

el acontecimiento inicial a partir del cual se propagaba la autodigestión de la glándula (Lerch and Gorelick, 2000). Hoy día se sabe que son muchos los factores que pueden desencadenar la PA y se pueden clasificar de acuerdo a diferentes categorías (Singh and Garg, 2016):

Procesos intraacinares: en esta categoría se incluye la activación de las enzimas de los gránulos de zimógeno, cambios en los mecanismos de autofagia, consecuencias de la génesis de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico.

Respuestas inflamatorias. Aquí se puede incluir la activación de factor de transcripción NFκB, la inflamación local y la sistémica, con la participación de células inmunitarias y diversas citocinas.

Síndrome de fallo multiorgánico: Con anormalidades microcirculatorias, trastornos de la coagulación, traslocación bacteriana con la consiguiente infección y la participación importante del tejido adiposo.

A pesar de que todos estos mecanismos son conocidos y en muchos casos están muy bien caracterizados, el traslado de los conocimientos básicos a la clínica sigue siendo una asignatura pendiente y el tratamiento clínico no ha sufrido cambios significativos en los últimos años. Más concretamente, lo que no se conoce bien todavía es la interrelación entre los distintos procesos y en particular, cómo una inflamación local se transforma en una patología sistémica.

La mayoría de los autores están de acuerdo en que el origen de la pancreatitis está en las alteraciones que sufre la célula acinar, de ahí que para implementar el desarrollo de tratamientos farmacológicos novedosos sea imprescindible conocer los receptores y mediadores que puedan estar involucrados en las diferentes rutas de señalización en las células acinares. Como esto no se puede estudiar directamente en los pacientes, se recurre a modelos experimentales para conocer los mecanismos fisiopatológicos involucrados. Los más empleados son modelos animales en los que se intenta reproducir la enfermedad (Hegyí *et al.*, 2013).

1.2. Pancreatitis aguda experimental

1.2.1. Modelos animales

Para estudiar la fisiopatología de la PA se han utilizado diversos modelos experimentales (Chan y Leung, 2007), cada uno con sus ventajas e inconvenientes, lo cual permite elegir el modelo animal adecuado para aquello que se desea estudiar. Lo ideal es que el modelo animal sea económico, reproduzca lo más fielmente posible la patología, esté bien estandarizado y responda a un tratamiento que pueda aplicarse en los pacientes; el problema surge cuando el tratamiento que ha resultado adecuado en el modelo animal de PA, no produce mejora en los pacientes.

Existe una gran variedad de protocolos que se pueden clasificar sobre la base de distintos criterios: El método empleado (técnica invasiva o no invasiva), la causa de la patología (obstructiva, isquémica, alcohólica) o la gravedad (edematosa o necrotizante y hemorrágica). Es especialmente útil para el estudio de los procesos tempranos de la enfermedad utilizar modelos que no produzcan necrosis y destrucción tisular, como el modelo de hiperestimulación con ceruleína (Cer) (Lampel y Kern, 1977). Cuando se trata de estudiar los efectos sistémicos graves, resulta muy adecuado el modelo de infusión de taurocolato sódico en el conducto biliopancreático de ratas (Aho *et al.*, 1980).

En este trabajo hemos utilizado el modelo de hiperestimulación con Cer en la rata.

1.2.2. Pancreatitis aguda inducida por hiperestimulación con ceruleína

La Cer es un análogo de la CCK derivado de la rana arbórea australiana *Litoria cerulea*, que, administrado *in vivo*, a dosis supramáximas, provoca una PA edematosa. Constituye el modelo ideal para el estudio de los cambios moleculares y celulares que se producen en la pancreatitis y reproduce los cambios patológicos que se producen en la fase temprana de la enfermedad (Mayerle *et al.*, 2013). La Cer se puede administrar de forma subcutánea, por inyección intraperitoneal o por infusión intravenosa, es un modelo altamente reproducible y, a dosis moderadas, permite que la pancreatitis se resuelva de forma espontánea.

La Cer, a dosis supramáximas, se une a receptores de CCK de baja afinidad y produce un bloqueo de la secreción enzimática (Saluja *et al.*, 1989); además, los gránulos de zimógeno se fusionan con los lisosomas (Saluja *et al.*, 1987), lo que tiene como consecuencia la activación del tripsinógeno en tripsina, y el comienzo de la autodigestión del páncreas. Recientemente se ha descrito (Messenger *et al.*, 2017) que la función de una proteína asociada a la membrana de los gránulos de zimógeno, denominada VAMP 8, e implicada en la secreción acinar, estaría inhibida con dosis supramáximas de CCK-8 y sería la responsable de la acumulación intracinar de tripsina y el bloqueo de tráfico intracelular, con el consiguiente daño acinar.

Por otra parte, Mayerle *et al.* (2005) han descrito que sólo 1 hora después del comienzo de la inducción de pancreatitis con Cer se produce la infiltración de células inflamatorias en el tejido pancreático y, según estos autores, las mismas proteasas digestivas activas pueden inducir la desgranulación de los neutrófilos, lo que produce un incremento en el contenido extracelular de elastasa, procedente de estas células sanguíneas. Otras consecuencias de la pancreatitis inducida por Cer se manifiestan en el núcleo celular con alteración de la cromatina, la dilatación del retículo endoplásmico y finalmente la muerte celular por apoptosis; no obstante, el páncreas se puede recuperar completamente, transcurridas 2 o 3 semanas después del comienzo de la inducción.

1.3. Fase temprana de la pancreatitis aguda

El estudio de la fase temprana de la PA es muy interesante desde el punto de vista teórico ya que nos puede desvelar el inicio del desarrollo de esta patología. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los pacientes con PA que llegan a las urgencias de los hospitales tienen ya unas molestias en forma de dolor abdominal más o menos fuerte y probablemente han rebasado ya la fase inicial de la enfermedad. Por ese motivo, se utilizan modelos experimentales si se quieren conocer los cambios moleculares que se producen inicialmente. Diferentes trabajos demuestran que durante las primeras etapas se produce un aumento en la expresión de algunos genes y proteínas (Sarmiento *et al.*, 2010; Fétaud-Lapierre *et al.*, 2013), por lo que se ha propuesto que las variaciones en algunas proteínas podrían tener un papel importante en el desarrollo de

la enfermedad. Por tanto, el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la PA, especialmente aquellos que se producen en los estadios tempranos de la enfermedad, sería de gran ayuda a la hora de establecer el mejor tratamiento, teniendo en cuenta que la ventana terapéutica de actuación es muy estrecha en esta patología.

2. LISOSOMAS

Los lisosomas son orgánulos intracelulares que contienen, en un medio ácido, más de 60 tipos de hidrolasas, enzimas que están implicadas en la degradación de materiales extracelulares que penetran en las células por endocitosis, y de componentes intracelulares, mediante autofagia (de Duve, 1983; Kornfeld y Mellman, 1989; Hunziker y Geuze, 1996; Xu y Ren, 2015). Los productos de degradación de los lisosomas son transportados hacia el citoplasma mediante transportadores específicos, para la homeostasis energética o su reutilización en rutas biosintéticas.

La génesis de los lisosomas implica el transporte de proteínas por vía biosintética directa (desde el *trans* Golgi) o, indirectamente, por vía endocítica (desde la membrana plasmática, vía endosomas).

Una de las características de los lisosomas es que se adaptan a la disponibilidad de nutrientes, de tal forma que esto influye sobre su número y su tamaño. En las células que están bien nutridas, los lisosomas son heterogéneos en tamaño (100-500 nm), morfología y distribución, y hay varios cientos de lisosomas en cada célula. Sin embargo, cuando escasea el alimento, el número de lisosomas por célula se reduce enormemente, a menos de 50 por célula y su tamaño se incrementa hasta 500-1500 nm (Xu y Ren, 2015).

Para mantener un ambiente ácido dentro del lisosoma es importante que la diferencia de potencial en la membrana lisosómica se mantenga entre -20 y -40 mV (Xu y Ren, 2015). Para ello, es imprescindible que funcionen correctamente los diferentes cotransportadores e intercambiadores iónicos de dicha membrana. Un ion especialmente importante es el Ca^{2+} , cuya concentración regula la fusión entre los

endosomas tardíos y los lisosomas; esta fusión es fundamental para que las enzimas hidrolásicas se sitúen en el interior del lisosoma (Saftig y Klumperman, 2009).

En resumen, los canales y transportadores de la membrana lisosómica regulan la concentración iónica, el potencial de membrana, la exportación de catabolitos, la interacción específica y fusión entre lisosomas y otros orgánulos (Fukuda, 1991; Peters y von Figura, 1994; Hunziker y Geuze, 1996) y la sensibilidad de la célula a nutrientes, de manera que cuando hay una disfunción en el tráfico de la membrana de los lisosomas, esto puede tener consecuencias patológicas importantes (Xu y Ren, 2015).

2.1. Proteínas de la membrana lisosómica. LIMP-2

Las proteínas de la membrana lisosómica tienen múltiples funciones, como se ha indicado en el apartado anterior. Además de los canales y transportadores, en la membrana de los lisosomas hay un grupo característico de proteínas que están muy glicosiladas, como LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3 (también llamada LIMP-1) y LIMP-2 (también llamada Limp II, LPG85 y SCARB2) (figura 2).

Las proteínas LAMPs (Lysosome associated membrane protein) son ricas en ácidos siálicos y se calcula que cubren, aproximadamente, el 80% de la superficie de la membrana lisosómica (Eskelinen *et al.*, 2003). Son proteínas que presentan un gran dominio luminal, con cadenas de oligosacárido unidas al aminoácido asparragina; tienen un único segmento transmembrana y un dominio citoplásmico corto. LAMP-2 tiene una función importante como receptor específico para la toma de proteínas citosólicas y su posterior degradación y también participa en los mecanismos de autofagia (Cuervo y Dice, 1998; Eskelinen *et al.*, 2002; Eskelinen *et al.*, 2003).

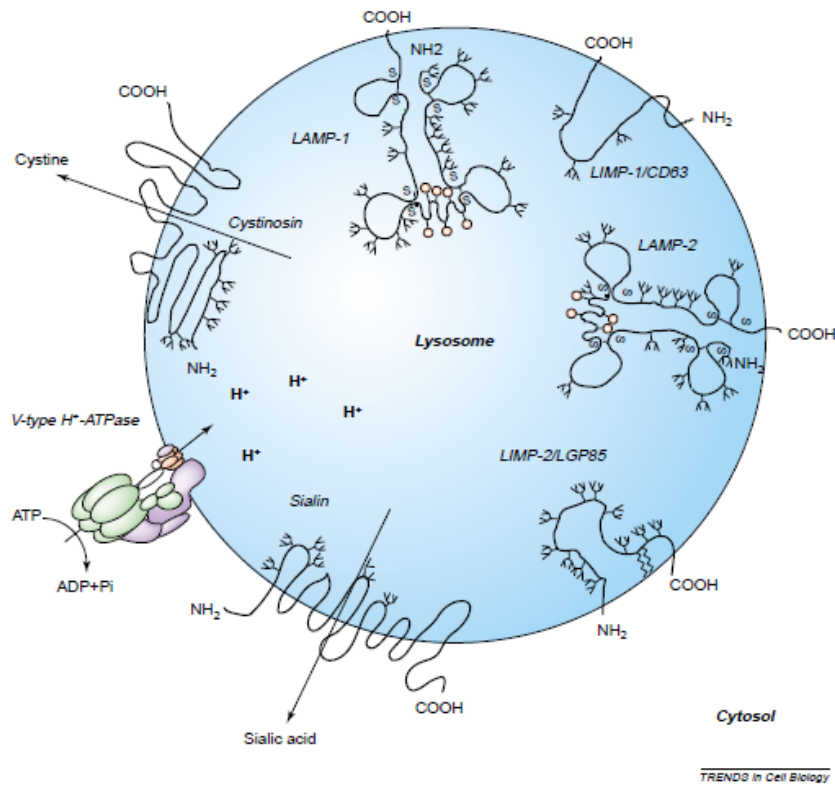


Figura 2. Principales proteínas de la membrana lisosómica. Las antenas indican posibles sitios de N-glicosilación y los círculos de O-glicosilación. LAMP: proteína de membrana asociada con el lisosoma LIMP: proteína integral de la membrana lisosómica; LGP: glicoproteína de la membrana lisosómica. (Tomado de Eskelinen *et al.*, 2003).

La proteína LIMP-2 (Lysosome integral membrane protein 2) está codificada por el gen SCARB2, presenta 2 segmentos transmembrana y sus extremos N-y C- terminales están localizados en el citosol (Fujita *et al.*, 1991; Vega *et al.*, 1991); en el lumen lisosómico tiene un asa muy glicosilada (Eskelinen *et al.*, 2003) (figura 2). LIMP-2 está presente en todos los tipos de células (Eskelinen *et al.*, 2003), es necesaria para la biogénesis y mantenimiento normales de los lisosomas y endosomas y se ha identificado como el receptor específico para glucocerebrosidasa, la enzima que es deficiente en la enfermedad de Gaucher (Gonzalez *et al.*, 2014). La señal responsable de dirigir LIMP-2 a los lisosomas es un motivo basado en dileucina presente en el dominio citoplasmático (Sandoval *et al.*, 1994).

Se ha señalado que LIMP-2 desempeña un papel en la activación temprana de macrófagos, uniendo la regulación de la maquinaria de fusión fagocítica de los

endosomas tardíos-lisosomas con el inicio de la respuesta inmune innata (Carrasco-Marín *et al.*, 2011). Además, el papel de LIMP-2 en la patología de la especie humana se ha expandido notablemente por su identificación como componente de los discos intercalares del músculo cardíaco y como receptor de algunos enterovirus (Malini *et al.*, 2015). También se ha demostrado su papel en la inflamación, ya que ratones deficientes en LIMP-2 mostraban un descenso en la inflamación en glomerulonefritis experimental (Lee *et al.*, 2014). Sin embargo, no hemos encontrado datos sobre la proteína Limp-2 en relación con la PA, por lo que uno de los objetivos de nuestro estudio se centra en analizar la expresión y dinámica de esta proteína durante la PA inducida por Cer.

2.2. Lisosomas y pancreatitis

La presencia de enzimas lisosómicas en el citosol de las células puede ser debida a fallos en los mecanismos biosintéticos o a rotura parcial o total de la membrana lisosómica, que provocaría su liberación al citoplasma. Esto tiene como consecuencia la actuación de estas enzimas sobre sustratos existentes en el citosol celular, lo que puede conducir finalmente a la muerte de la célula.

Se ha descrito que durante la PA hay un aumento en la fragilidad de la membrana lisosómica (Saluja *et al.*, 1987; Steer y Meldolesi, 1988; Guillaumes *et al.*, 1996; Bragado *et al.*, 1998); en este sentido, nosotros observamos aumento de la actividad de algunas enzimas lisosómicas (Sarmiento *et al.*, 2011) en la fracción citosólica de páncreas de ratas pancreatíticas, cuando se comparan con datos de ratas control. Esto sugiere la existencia de alteraciones en la membrana lisosómica, lo cual, según algunos autores (Fortunato *et al.*, 2009) jugaría un papel crítico en los estadios iniciales de la PA. Además, durante la pancreatitis se ha indicado la colocalización de enzimas lisosómicas con proenzimas de los gránulos de zimógeno, con la consiguiente activación de éstas últimas (Krüger *et al.*, 2000), lo que se ha correlacionado con el aumento sostenido en la concentración de calcio citosólico libre (Gerasimenko *et al.*, 2017). La fusión de los zimógenos con los lisosomas es reflejo de alteraciones en el tráfico intracelular, las cuales podrían estar relacionadas con un deterioro en el proceso de autofagia.

La autofagia es un mecanismo citoprotector (Lippai y Szatmári, 2017) que consiste en que diferentes partes del citoplasma, incluyendo orgánulos y componentes citoplásmicos, se engloban en vesículas denominadas autofagosomas para, después, verse en los lisosomas, donde se degrada ese material autofágico. La última etapa de la autofagia implica, por lo tanto, la fusión, dependiente de Lamp-2, de autofagosomas con lisosomas, para formar autolisosomas (también llamados autofagolisosomas) (figura 3) (Levine and Kroemer, 2008).

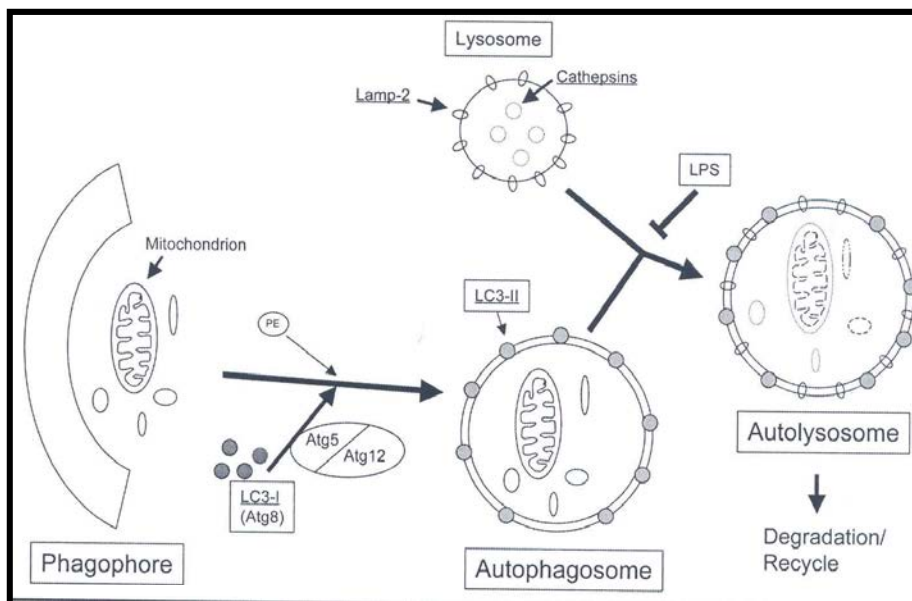


Figura 3. Ruta hacia la autofagia propuesta para las células de mamífero. (Fortunato y Kroemer, 2009).

Así pues, las proteínas destinadas a degradarse se unen al dominio citosólico de LAMP-2 y luego son transportadas hacia el interior del lisosoma para su degradación (Cuervo y Dice, 1996). Dado que el proceso de autofagia depende de LAMP-2, una disminución de sus niveles en lisosomas conduce a un deterioro del proceso autofágico (Eskelinen *et al.*, 2003).

En células de mamíferos se han detectado distintos lugares del citoplasma donde pueden formarse autofagosomas. Algunos estudios sugieren que varios orgánulos aportan membranas para la biogénesis de autofagosomas; entre ellos están el retículo endoplasmático, las mitocondrias y la membrana plasmática (Weidberg *et al.*, 2011). Al actuar como un mecanismo citoprotector, la autofagia se activa en respuesta a

estímulos asociados con el estrés fisiológico, incluyendo la acumulación de proteínas mal plegadas o el estrés oxidativo (Weidberg *et al.*, 2011), procesos que se producen en la PA.

Uno de los primeros signos de daño descritos en el tejido pancreático durante la pancreatitis fue la vacuolización citoplasmática, que se observó en primer lugar en muestras humanas. Se ha indicado también que durante la pancreatitis la autofagia podría estar relacionada con la activación del tripsinógeno (Hashimoto *et al.*, 2008) y con la formación de vacuolas (Mareninova *et al.*, 2009) en las células acinares. Nuestro grupo de investigación ha observado la aparición de grandes vacuolas en subpoblaciones enriquecidas en lisosomas de páncreas de ratas tratadas con Cer (Sarmiento *et al.*, 2011).

Recientemente se ha descrito que la gravedad de la pancreatitis está relacionada con el deterioro de las rutas autofágicas y endocíticas en las que están implicados los lisosomas (Takahashi *et al.*, 2017); concretamente, según este artículo, la GTPasa monomérica Rab 7 juega un papel protector en la pancreatitis aguda. Sin duda, este es un tema que todavía requiere más investigación para ser conocido en profundidad, pero todas estas observaciones proporcionan información valiosa para el desarrollo de nuevas estrategias en el tratamiento de la pancreatitis.

3. FOSFORILACIÓN EN TIROSINA. PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASAS

La fosforilación en tirosina de las proteínas es un hecho crucial que está implicado en los procesos más importantes del metabolismo celular. El estado de fosforilación en tirosina de una proteína diana es controlado por el balance y la acción opuesta de proteínas tirosina quinasas (PTKs) y proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) (Hunter, 1987). Las PTKs transfieren el grupo fosforilo (PO_3^{2-}) desde el ATP a un residuo de tirosina en su propia estructura o en una proteína diana, mientras que las PTPs catalizan la eliminación hidrolítica del grupo fosfato para generar la proteína desfosforilada y un residuo de fosfato inorgánico.

Las PTPs constituyen una gran familia de 107 enzimas de señalización, y aunque fueron consideradas como enzimas con poca o ninguna especificidad de sustrato, la investigación ha demostrado, en las últimas dos décadas, los papeles esenciales de las PTPs en la transducción de señales (Tonks, 2013); así, tienen la capacidad de actuar negativamente en la regulación de la señalización, desfosforilando sitios de autofosforilación en las propias PTKs ó en sus dianas (figura 4, panel superior), pero también pueden tener un papel *positivo*, por ejemplo desfosforilando un sitio inhibitorio en una PTK, y por consiguiente, activando la kinasa y promoviendo la fosforilación y la señalización (figura 4, panel inferior).

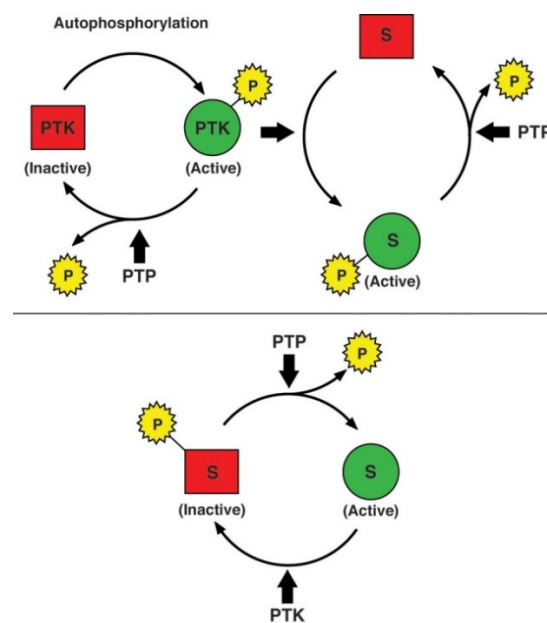


Figura 4. Función en la señalización de proteína tirosina fosfatasa (Tonks, 2013).

La desregulación de la actividad de las PTPs está unida a muchas enfermedades humanas, como el cáncer, la diabetes, la obesidad, los trastornos autoinmunes, las enfermedades neurológicas e infecciosas o la inflamación. Por lo tanto, la mayoría de las PTPs son objetivos moleculares para el diseño de fármacos (Ruddraraju y Zhang, 2017).

3.1. Clasificación de las proteína tirosina fosfatasas. Características estructurales

Las PTP pueden dividirse en cuatro grupos en base a su estructura y especificidad de sustrato (Alonso *et al.*, 2004). El grupo I incluye las PTPs “clásicas” (38 miembros) que son específicas para fosfotirosina (pTyr). Estas PTPs se subdividen en dos categorías, basadas en su localización subcelular: PTPs intracelulares (por ejemplo, PTP1B, SHP, HePTP, STEP, etc.) y PTPs similares a receptores (por ejemplo, CD45, LAR, PTP α , PTP β , PTP σ , etc.). El grupo II comprende fosfatasas duales específicas (DSPs, 61 miembros) que pueden hidrolizar fosfato desde tirosina, serina / treonina, fosfatidilinositol y glucógeno. Por tanto, las DSP constituyen el grupo más diverso en términos de especificidad de sustrato y pueden dividirse en varios subgrupos, que comparten menos identidad de secuencia entre ellas. Esta familia contiene tipos de fosfatasas muy especializadas; entre las que se encuentran fosfatasas regeneradoras de hígado (PRLs), fosfatasas de proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), myotubularinas, PTEN, DSP atípicas ó CDC14s (Ruddraraju y Zhang, 2017). El grupo III consta solamente de un miembro, la fosfotirosina fosfatasa de bajo peso molecular (LMW-PTP); en humanos, esta clase está representada por una proteína de 18 kDa. La actividad de LMW-PTP está regulada por oxidación reversible de residuos de cisteína y el estado de fosforilación en tirosina (Alho *et al.*, 2013). Las PTPs del grupo IV están representadas por tres fosfatasas: CDC25A, CDC25B y CDC25C (CDC: ciclo de división celular). Estas tres enzimas desfosforilan las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) en sus motivos Thr/Tyr inhibidores del extremo N-terminal. Esta desfosforilación conduce a la activación de las CDKs para dirigir la progresión ciclo celular (Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006).

Con respecto a su estructura, todas las PTPs son fosfatasas dependientes de cisteína con un dominio catalítico característico constituido por unos 280 aminoácidos, que presenta un motivo conservado formado por 7 aminoácidos C(X)₅R esencial para la catálisis (Tonks, 2013). En este trabajo se han determinado las PTPs SHP1, SHP2 y PTP1B.

SHP-1 y SHP-2 son proteínas con dominios SH2, que son homólogos a los SH2 de la familia tirosina quinasa del virus del sarcoma de Rous (del inglés, Src Homology2) en

el extremo N terminal de la molécula. SHP-1, también llamada PTPN6, PTP1C, SH-PTP1 y HCP es codificada por el gen *PTPN6*. SHP-2, conocida como PTPN11, SHPTP2, Syp, PTP1D, PTP 2C y SH-PTP3, está codificada por el gen *PTPN11*. Aunque estructuralmente SHP-1 y SHP-2 son muy similares, tienen diferentes funciones en la transducción de señales.

La proteína PTP1B (codificada por *PTPN1*) se caracteriza por poseer un segmento carboxilo terminal hidrofóbico por el que se encuentra anclada a la membrana del retículo endoplásmico. Cuando dicho anclaje es catalizado por calpaína resulta en una relocalización desde dicha membrana hasta el citosol (Frangioni *et al.*, 1993). PTP1B es una proteína abundante y varios estudios la implican en la función pancreática (Bettaieb *et al.*, 2016).

3.2. Dominio catalítico de las proteína tirosina fosfatasas

El dominio catalítico de las PTPs está constituido por una lámina β paralela central, rodeada por α -hélices, que abarca el motivo señal de una PTP, (I/V)HCXXGXXR(S/T), también llamado asa catalítica o asa P (Neel y Tonks, 1997). Esta asa consiste en 11 residuos de aminoácidos, de las cuales la cisteína y la arginina son críticas para la actividad catalítica. En la figura 5 se muestran los residuos esenciales para la catálisis en la estructura del dominio catalítico de PTP1B.

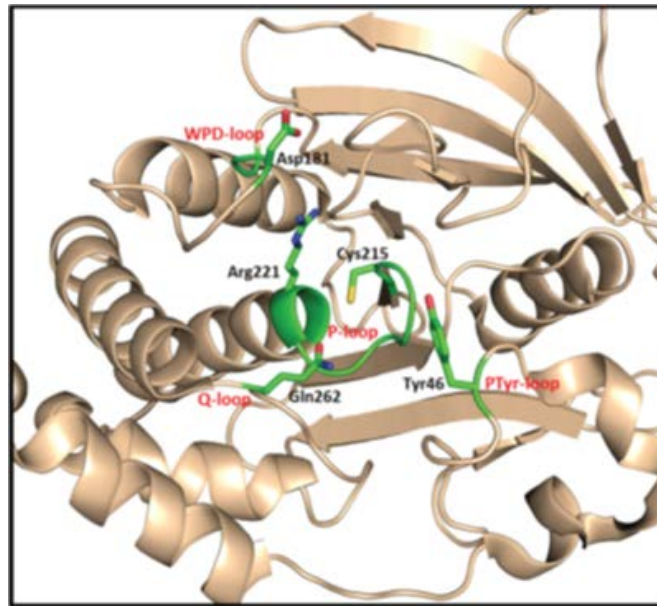


Figura 5. Estructura de rayos X de PTP 1B mostrando los residuos clave para la actividad catalítica (Ruddraraju y Zhang, 2017).

El grupo tiolato de la cisteína del sitio activo (Cys215 en PTP1B) funciona como el nucleófilo atacante para iniciar la hidrólisis del éster monofosfato. La arginina del sitio activo (Arg221 en PTP1B) es un residuo altamente conservado entre las PTPs y es esencial para la unión al sustrato fosfotirosina; también estabiliza el estado de transición mediante la formación de un par de puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno del fosfato (Jia *et al.*, 1995). El asa WPD (triptófano, prolina y ácido aspártico) es, asimismo, un asa superficial y flexible, conservada en las PTPs y puede tener una conformación abierta o cerrada. Un único ácido aspártico localizado en dicho asa (Asp181 en PTP1B) actúa de catalizador ácido/base general en la reacción de desfosforilación (Ruddraraju y Zhang, 2017).

El asa pTyr contiene un residuo de tirosina (Tyr46 en PTP1B) que define la profundidad de la hendidura del sitio activo y contribuye a la especificidad de sustratos con pTyr.46 (Tonks, 2003).

3.3 Regulación de las proteína tirosina fosfatasas

La localización de las PTPs dentro de la célula es un aspecto relevante para la regulación de su actividad ya que determina el acceso de cada enzima a un determinado grupo de sustratos, originándose así una especificidad por el mismo (Hernández-Hernández *et al.*, 1999). Las PTPs citosólicas contienen secuencias o dominios no catalíticos en su extremo amino terminal que podrían modular la función de estas proteínas, dirigiéndolas a compartimentos subcelulares específicos o autoregulando su actividad mediante el bloqueo de su centro catalítico, como es el caso de los dominios SH2 de SHP-1 y SHP-2. Concretamente, la actividad SHP-1 y SHP-2 en la célula, podría estar regulada por diferentes mecanismos de un modo positivo o negativo (Persson *et al.*, 2004): La fosforilación de residuos de tirosina podría aumentar su actividad de dos a cuatro veces; la traslocación a diferentes zonas puede limitar su capacidad para defosforilar sustratos. Además, los dominios SH2 tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad PTP, de modo que cuando la enzima se une a una fosfoproteína ese efecto inhibitorio desaparece. Aunque estructuralmente SHP-1 y SHP-2 son similares, sus funciones en las distintas vías de señalización celular no son coincidentes, como se ha indicado en el apartado 3.1. Probablemente, esto se debe a diferencias en su dominio catalítico y a la especificidad que tienen los dominios SH2 de cada una de ellas para interactuar con cierta clase de proteínas. Esta afinidad de los dominios SH2 por moléculas específicas, explicaría por qué estos dominios no son intercambiables (Neel *et al.*, 2003).

Es conocido que SHP-1, SHP-2 y PTP1B, actúan como reguladores de la señalización de diversos receptores ligados a PTK, incluyendo por ejemplo, los receptores de citoquinas y de factores de crecimiento o las integrinas (Pao *et al.*, 2007). Generalmente, SHP-1 se considera un regulador negativo en la señalización intracelular, mientras que SHP-2 es considerado un regulador positivo; sin embargo, existen procesos en los que esto no ocurre. En el caso de SHP-2, varios estudios la sitúan como activador de Ras. Ras es una de las proteínas que participan en la activación de las MAPK. Las MAPK desencadenan la activación de ERK en la señalización de receptores de citoquinas y factores de crecimiento (Kontaridis *et al.*, 2004). Además, se ha descrito que SHP-1 y SHP-2 son reguladores negativos de la señalización mediada por citoquinas mediante

desfosforilaciones en JAK y STAT. Por lo tanto, SHP-1 es capaz de desfosforilar a JAK1, JAK2, JAK3 y STAT5. Y SHP-2 desfosforila a JAK2, STAT1 y STAT2.

Finalmente, se ha sugerido que las PTPs pueden estar reguladas por mecanismos de oxidación. Como se ha indicado, el residuo de cisteína es esencial durante la catálisis. Las cisteínas catalíticas son susceptibles a la oxidación debido a su bajo pKa. La cadena lateral de la cisteína está formada por un grupo SH y, para que aquella sea funcional, el azufre se debe encontrar en forma de tiol (S-) o de sulfhidrilo (SH). Sin embargo, algunos oxidantes pueden oxidar el grupo tiol hasta ácido sulfénico (SOH) o ácido sulfónico (SO₃H). La oxidación inhibe la capacidad de las PTPs para desfosforilar sus sustratos, actuando así como sensores del estado redox de la célula (Groen *et al.*, 2005).

Todas las rutas de señalización descritas anteriormente, en las cuales interviene SHP-1 y/o SHP-2 se han implicado en el desarrollo de la PA.

3.4. Papel de las proteína tirosina fosfatasas en la pancreatitis aguda

Los papeles de las PTPs en la PA todavía están en gran parte inexplorados, aunque algunos estudios demuestran alteración de la expresión y actividad de PTPs en modelos de PA en roedores. Nosotros hemos demostrado que la PA inducida por Cer está asociada con una expresión aumentada de fosfatasas SHP1, SHP2 y PTP1B (Sarmiento *et al.*, 2008, 2010). Otros autores han indicado que los niveles de PTPs de las células T (TCPTP) se elevan en el inicio de la enfermedad, y que la deficiencia de TCPTP pancreática mitiga la PA inducida por Cer en ratones (Bettaieb *et al.*, 2014).

Recientemente, Bettaieb *et al.* (2016) han estudiado los efectos de la deficiencia de PTP1B pancreática sobre la PA experimental, usando modelos inducidos por arginina o Cer, y han concluido que la deficiencia de esta PTP exacerba la PA en ratones. Los mecanismos moleculares subyacentes a las acciones de PTP1B pancreática en PA aún no se han determinado, pero pueden abarcar directa y/o indirecta modulación de la inflamación, MAPKs, y respuestas al estrés del retículo endoplásmico.

Así pues, diferentes estudios implican a las PTPs en PA, pero se requiere más investigación para conocer la contribución de estas enzimas a la patogénesis de la enfermedad.

4. PROTEÓMICA

4.1. Concepto

La proteómica se puede definir como el estudio del proteoma mediante el uso de tecnologías de separación de proteínas a gran escala, incluyendo tanto su identificación y cuantificación, como el estudio de su localización, modificaciones, interacciones, actividades y función. El proteoma de una célula es mucho más complejo y dinámico que el genoma o el transcriptoma de la misma, debido al proceso de corte y empalme alternativo postranscripcional y a las modificaciones postraduccionales de las proteínas. Además, la traducción, las modificaciones postraduccionales y la degradación de las proteínas, están muy reguladas, lo que contribuye aún más al dinamismo del proteoma (Williams, 2013). El objetivo de la proteómica es identificar todas las proteínas expresadas en un determinado estado de desarrollo de un organismo, tejido, célula o fracción subcelular y caracterizar los cambios, tanto cualitativos como cuantitativos, que sufren en determinadas situaciones o patologías (Hanash, 2003; Reisinger y Eichacker, 2006).

En su origen, *proteómica* hacía referencia a la técnica denominada electroforesis bidimensional (2-DE), aunque actualmente abarca cualquier técnica o procedimiento que estudie grandes conjuntos de proteínas. Durante los últimos años se han hecho múltiples mejoras tecnológicas de la 2D-PAGE, se han desarrollado nuevas técnicas en el campo de la proteómica y se han hecho avances en los métodos de tinción, siendo cada vez más sensibles; tal es el caso de las tinciones fluorimétricas, o de los métodos de marcado específicos, como el sistema de electroforesis diferencial en gel (DIGE).

Un destacado avance en la evolución del estudio proteómico fue el desarrollo de métodos alternativos a la 2-DE para el análisis a gran escala de la expresión proteica, que permiten catalogar cientos - e incluso miles - de especies proteicas contenidas en diversas muestras biológicas (Patterson and Aebersold, 2003). Estas técnicas,

generalmente denominadas técnicas de proteómica *shotgun* o de análisis masivo, se basan en la combinación del análisis LC-MS/MS con la búsqueda de secuencias en bases de datos, y están siendo ampliamente utilizadas para el análisis de mezclas complejas de péptidos generados por la proteólisis de muestras proteicas heterogéneas. La incorporación del marcado isotópico diferencial (ICAT) permitió convertir la proteómica *shotgun* en un método de cuantificación relativa para la caracterización proteica. Entre los métodos ICAT, tiene especial repercusión el uso de las etiquetas isobáricas iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) o TMT (Tandem Mass Tags) (Wolters *et al.*, 2001).

Otros factores que han influido notablemente en el desarrollo de la proteómica han sido el enorme progreso en las técnicas de identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MS), y la creación de un gran número de herramientas bioinformáticas y bases de datos de genes y proteínas en la World Wide Web (www) (Righetti, 2004). Además, se han desarrollado programas informáticos de análisis de imágenes 2D, basados en algoritmos de trabajo rápido, que permiten analizar y comparar datos con una mínima mediación manual. Por otra parte, se han creado bases de datos cada vez más extensas y completas, que contienen información detallada sobre todas las proteínas caracterizadas hasta el momento, así como datos experimentales de 2-DE, tales como pI, Mr, nivel de expresión bajo diferentes condiciones, localización subcelular, información sobre MPT, etc. Algunas de las bases de datos más importantes son la *Human Protein Reference Database* (<http://www.hprd.org>), la *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o *UniProt* (<http://www.uniprot.org>), que contienen gran cantidad de información sobre proteínas humanas y de otras especies, como la rata.

Todos estos avances han permitido desarrollar numerosos estudios para conocer más profundamente el proteoma de diversas especies y modelos experimentales.

4.2. Técnicas de prefraccionamiento en proteómica

Una estrategia bastante empleada en los procesos experimentales en los que se usa la proteómica, es el fraccionamiento previo de la muestra a tratar por dicha técnica,

con el fin de enriquecer la muestra con las proteínas de interés o de subdividirla en varias fracciones en función de una característica proteica; de este modo, se consigue el análisis de una mayor cantidad de proteínas, incluidas las menos abundantes.

En este estudio se ha llevado a cabo la separación de las muestras de páncreas en diferentes fracciones subcelulares. La visión conjunta de los resultados nos informa, a nivel proteómico, de lo que acontece en la fase temprana de la PA, considerando la subdivisión en fases de la PA que hace nuestro grupo de investigación (ver Métodos, sección 2.1.).

4.3. Técnica proteómica 2D-PAGE

Para optimizar la separación de las proteínas por 2-DE es necesario que cada dimensión se resuelva con parámetros independientes. La suma de las resoluciones de cada uno de dichos parámetros debería ser, en teoría, la resolución final de la técnica, siempre y cuando el uso de ambos no implique una pérdida de sus capacidades de separación individuales. Por ello, los sistemas de elección más utilizados son el IEF y la SDS-PAGE, debido a su elevada resolución conjunta y a las distintas propiedades proteicas en las que se basan.

La 2-DE es una técnica con una gran resolución y buena reproducibilidad. En la primera dimensión: IEF, las proteínas se separan según su pI. Estas se van moviendo por una matriz de acrilamida que presenta un gradiente de pH, gracias a la presencia de un campo eléctrico, hasta que su carga neta es cero (“enfoco” de las proteínas). En la segunda dimensión: SDS-PAGE, se separan las proteínas en base a su masa relativa (*Mr*). Después de la electroforesis, las proteínas pueden detectarse mediante métodos directos (tinción) o bien con técnicas indirectas (autorradiografía, transferencias de *Western*, etc.). Además, es posible recuperar una especie proteica a partir de un gel 2D, lo que permite su identificación, caracterización y uso.

En la última década se han desarrollado enormemente los sistemas de digitalización y de análisis de imagen por ordenador, permitiendo la evaluación de cientos de *spots* en los mapas 2D. Además, actualmente son accesibles en Internet varias

bases de datos sobre 2-DE, permitiendo la consulta de mapas estándar de distintos tejidos y células, así como el acceso a información acerca de proteínas conocidas, su secuencia, gen codificante, etc.

Por lo tanto, la 2-DE es una herramienta valiosa y ha sido utilizada en muchos casos para revelar proteínas asociadas con patologías, que pueden ayudar en el descubrimiento de biomarcadores. Aunque la técnica se introdujo por primera vez hace más de tres décadas, todavía existen algunos retos y limitaciones de su uso, por lo que se van desarrollando nuevos avances metodológicos y aplicaciones de la misma (Magdeldin *et al.*, 2014).

4.4. Espectrometría de masas

La identificación de proteínas se suele realizar mediante métodos basados en la espectrometría de masas (MS), como el análisis de huella peptídica, el análisis de aminoácidos o el etiquetado de secuencia peptídica (VanBogelen y Olson, 1995; Jungblut *et al.*, 1996; Wilkins *et al.*, 1996).

Normalmente, las proteínas que se identifican mediante MS se separan por una 2-DE, tras la cual se extraen del gel de acrilamida y se digieren con la enzima tripsina, que corta exclusivamente en los extremos C-terminales de residuos de Arg y Lys (Olsen *et al.*, 2004). Posteriormente, los péptidos trípticos son ionizados mediante electroespray (ESI), desarrollado por Fenn *et al.*, (1989) o mediante ionización con láser asistida por matriz (MALDI), desarrollado por Karas y Hillenkamp (1988). Una vez ionizados, se analizan mediante un espectrómetro de masas, el cual mide la relación masa/carga (m/z) de los analitos. Los tres métodos más usados para obtener estas medidas son: la separación en base al tiempo de vuelo (TOF) del analito por el espectrómetro, la separación mediante campos eléctricos cuadrupolos (q) generados por cilindros metálicos y la separación por eyección selectiva de iones desde una trampa iónica (IT) tridimensional o por resonancia ciclotrónica de iones (ICR) transformada de Fourier (FT) Mann *et al.* (2001).

Para identificar una proteína en base a sus péptidos trípticos se usa el método de la huella de masa peptídica (PMF), en el que se combina una técnica de ionización con un solo tipo de separación en el espectrómetro, generalmente MALDI-TOF y ESI-IT.

Para conocer la estructura o la composición de los péptidos trípticos, éstos se fragmentan una segunda vez (MS_2) o más (MS_n), utilizándose un método de ionización con dos o más separaciones basadas en el mismo principio, o mediante técnicas diferentes. A esto se lo denomina *tándem de masas* (MS/MS). En este caso, las distintas técnicas que se pueden combinar son diversas, pudiendo ser MS/MS tanto en el espacio, (si hay dos espectrómetros acoplados) como en el tiempo (si se producen dos fases de análisis en el mismo espectrómetro). Las combinaciones más frecuentes son de tipo MALDI-TOF/TOF, MALDI-qTOF, ESI-qTOF y ESI-IT/FT-ICR. Gracias a toda esta tecnología se pueden secuenciar los péptidos, analizar las modificaciones postraduccionales e incluso realizar el estudio de proteínas intactas, no digeridas previamente con tripsina.

Para cada péptido tríptico se obtiene una relación de m/z y el conjunto de todos ellos se compara mediante diversos programas informáticos con los valores de m/z calculados para péptidos trípticos teóricos (descritos en bases de datos como NCBI nr o Swiss-Prot). En función de la coincidencia entre los resultados experimentales y los teóricos, se establece un orden jerárquico de posibles proteínas, otorgándoles además una probabilidad estadística de identificación correcta en función de la precisión de la coincidencia de masas y de la secuencia conseguida experimentalmente.

4.5. Técnica proteómica TMT

La técnica TMT (*Tandem Mass Tag*) es una técnica proteómica de alto rendimiento, que permite la identificación y cuantificación simultánea de los componentes de una mezcla proteica compleja. Consiste en la incorporación de marcadores de masa isobárica (diferentes formas de una molécula de idéntica estructura química y la misma masa total). Estos marcadores se unen de modo covalente al extremo amino terminal de péptidos y proteínas, así como a residuos de lisina. Además, en su estructura presentan una región lábil, el ion reportero, con tendencia a liberarse preferentemente en las condiciones de fragmentación de MS/MS

(*espectrometría de masas en tándem*). Los iones reporteros son característicos de cada etiqueta y detectables a diferente relación m/z . Esta técnica permite el mezclado de las muestras antes de la cromatografía líquida (LC-MS/MS), por lo que diferentes especímenes pueden unirse de forma simultánea. La cuantificación selectiva de las proteínas se obtiene comparando las intensidades de los diferentes iones en el espectro MS/MS (Dayon y Sanchez, 2012).

4.6. Fosfoproteómica

La fosforilación proteica, una de las modificaciones postraduccionales más frecuentes en la célula, es un mecanismo esencial para la regulación de múltiples procesos celulares críticos - como la señalización inter e intracelular, la proliferación o diferenciación celular, la apoptosis o la síntesis proteica -, por lo que ha de estar modulada de forma precisa por una red de quinasas y fosfatasas específicas (Yan and He, 2008).

La principal herramienta para el estudio de fosforilación proteica es la fosfoproteómica, que se centra en la identificación y cuantificación de los sitios de fosforilación presentes en tipos celulares, tejidos u organismos específicos. Las principales tecnologías empleadas en estos análisis incluyen el uso de anticuerpos y las técnicas basadas en LC-MS, en ocasiones usadas de forma combinada (Casado *et al.*, 2017).

Una característica particular de los fosfopéptidos, que determina el flujo de trabajo de las técnicas fosfoproteómicas, radica en la estequiometría de la reacción de fosforilación por la que la forma fosforilada se va a encontrar en una abundancia muy inferior a la no fosforilada. Además, la detección de fosfopéptidos se ve también desfavorecida por su habitual mala ionización. En este sentido, la incorporación de un paso de enriquecimiento de los fosfopéptidos previo a su análisis por LC-MS mejora sustancialmente su detección. Entre las diferentes estrategias de enriquecimiento, las más comúnmente empleadas son las columnas cromatográficas de metales inmovilizados (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatograph) u óxidos metálicos, principalmente dióxido de titanio (TiO_2) (Engholm-Keller and Larsen, 2013).

En la figura 6 se ilustra el flujo de trabajo fundamental de las técnicas fosfoproteómicas basadas en LC-MS.

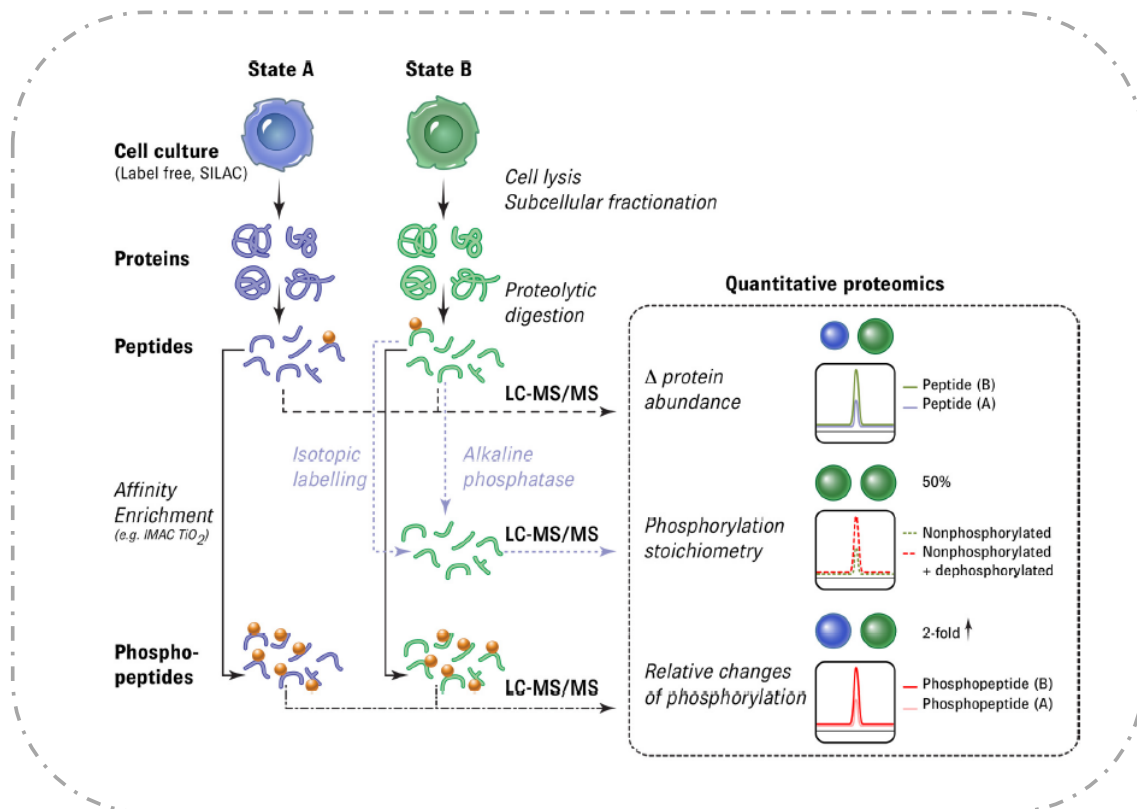


Figura 6. Flujo de trabajo de las técnicas fosfoproteómica basadas en MS. Adaptado de Roux and Thibault (2013).

4.7. Proteómica del páncreas

Gracias a todos los avances que se han producido en las técnicas de análisis proteómico en los últimos años, se ha podido ampliar nuestro conocimiento sobre el proteoma de múltiples órganos humanos, entre los cuales se encuentra el corazón, el cerebro, el hígado y el riñón. Sin embargo, no se han hecho tantos estudios sobre el páncreas humano, debido a su localización corporal de difícil acceso y a que posee numerosas enzimas digestivas que provocan una rápida degradación del tejido y dificultan su investigación (Hu *et al.*, 2004).

En el caso que nos concierne, el páncreas, resulta muy interesante estudiar el proteoma de su fracción exocrina, con el fin de identificar cambios en proteínas cuya expresión se ve alterada durante el desarrollo de determinadas enfermedades como la PA o el cáncer de páncreas. Esto permitiría desenmascarar nuevos biomarcadores útiles tanto para el diagnóstico como el pronóstico de dichas patologías (Fétaud *et al.*, 2008; Saraswat *et al.*, 2017).

4.7.1. Estudio del proteoma del páncreas en la pancreatitis aguda

Hasta el momento se han llevado a cabo análisis proteómicos relacionados con el páncreas y la PA en tres tipos de muestras: células o líneas celulares pancreáticas, tejido pancreático de modelos animales, y jugo pancreático de pacientes con pancreatitis. La mayor parte de estos estudios se basan en la premisa de que las proteínas puedan incrementarse tanto por síntesis como por migración hacia dentro del páncreas, y verse disminuidas por degradación o posible secreción.

4.7.1.1. Estudios en células o líneas celulares pancreáticas

Los primeros estudios proteómicos que emplearon células acinares de rata como modelo de PA se basaron en la hiperestimulación con Cer de líneas de células acinares AR42J. Se comprobó el incremento en la expresión de diversas proteínas de choque térmico (Yu *et al.*, 2003, 2008), de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y la producción de radicales libres de oxígeno, así como incrementos o descensos en proteínas relacionadas con la señalización celular o la organización del citoesqueleto (Lee *et al.*, 2010). También se realizó un estudio donde las células AR42J se estimularon mediante ácido taurolitocólico (Li *et al.*, 2012).

4.7.1.2. Estudios en tejido pancreático de modelos animales

En extractos de páncreas de ratas con PA inducida por Cer se ha observado el incremento o disminución de distintas proteínas relacionadas con la respuesta a la

inflamación (Fétaud *et al.*, 2008), al estrés (Hu *et al.*, 2004; Fétaud *et al.*, 2008) y la apoptosis (Fétaud *et al.*, 2008).

En un modelo de PA inducido por administración retrógrada de taurocolato en el conducto pancreático (Zhang *et al.*, 2012) se observó, asimismo, el aumento de proteínas relacionadas con el estrés.

También se han llevado a cabo otro tipo de técnicas proteómicas, como el IEF seguido de cromatografía líquida de fase reversa (rpHPLC) (Fétaud-Lapierre *et al.*, 2010) o el estudio del peptidoma por LTQ Orbitrap (Lassout *et al.*, 2010) en un modelo de PA inducida por Cer. En estos estudios se observó que en PA se producían modificaciones en la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria y con la respuesta al estrés, así como de enzimas digestivas.

Por otro lado, se han realizado estudios proteómicos en orgánulos específicos; tal es el caso de los zimógenos, con el fin de desenmascarar los mecanismos moleculares del transporte y exocitosis de estos orgánulos (Wishart *et al.*, 1993; Höfken *et al.*, 1998; Williams, 2001; Chen *et al.*, 2004, 2006; Rindler *et al.*, 2007; Chew *et al.*, 2008; Faust *et al.*, 2008; Vaccaro *et al.*, 2008; Borta *et al.*, 2010). Otro orgánulo donde se han llevado a cabo estudios proteómicos de PA es el retículo endoplasmático rugoso (RER). En éste se han identificado abundantes proteínas secretoras, incrementos de chaperones moleculares y una disminución de proteínas relacionadas con la modificación de lípidos (Chen *et al.*, 2010).

4.7.1.3. Estudios en jugo pancreático de pacientes con pancreatitis

Los estudios proteómicos que emplean jugo pancreático se han diseñado, hasta el momento, en humanos y con el objetivo de encontrar marcadores de inflamación benigna (caso de la pancreatitis) o maligna (caso del cáncer de páncreas). También se han descrito aumentos en determinadas proteínas implicadas en la coagulación sanguínea, en la inflamación y fibrinólisis (Chen *et al.*, 2007). Actualmente, se está intentando establecer el perfil de biomarcadores en jugo pancreático y en bilis, que sirvan para conocer el pronóstico del adenocarcinoma pancreático ductal (Agrawal, 2017).

En relación a la fosfoproteómica del páncreas, no hemos encontrado datos que describan los cambios de fosforilación proteica producidos específicamente durante el desarrollo de pancreatitis aguda.



II. Objetivos

Los mecanismos moleculares implicados, principalmente, en las fases iniciales de la pancreatitis no se comprenden en su totalidad, aunque puede predecirse que las alteraciones de la expresión proteica en la fase temprana de la PA serán relevantes para el desarrollo posterior de dicha patología.

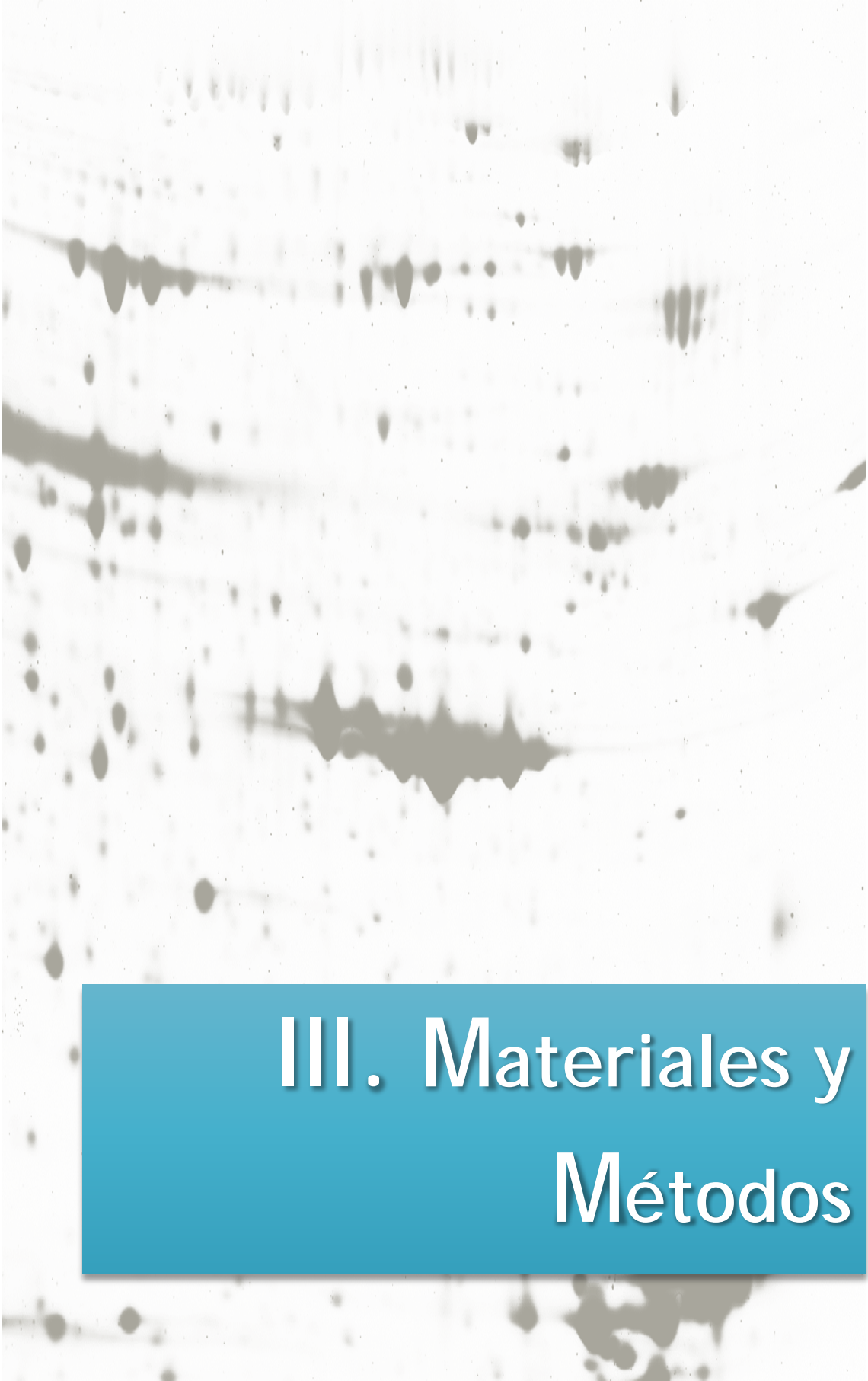
Los lisosomas juegan un papel fundamental en el desarrollo de la pancreatitis, y curiosamente, la PA presenta características similares a las que se observan en las enfermedades lisosómicas, tales como el bloqueo de la autofagia, la no maduración de las catepsinas, la disminución de la degradación proteica, la vacuolización, la muerte celular y la respuesta inflamatoria (Nixon *et al.*, 2008; Mareninova *et al.*, 2009). Desde hace algunos años estamos estudiando el papel que juegan los lisosomas, y en concreto alguna de sus proteínas más abundantes, como son las proteínas LAMP y LIMP, en el desarrollo de la pancreatitis. Además, se conoce que en la PA se activan diversas rutas de señalización que modulan la fosforilación proteica, tales como las que integran diversas proteína tirosina quinasas (PTKs), proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) o el receptor A1 de adenosina (que disminuye los niveles intracelulares de AMPc). Relacionado con lo anterior, en nuestro laboratorio se demostró recientemente que la expresión de tres proteína tirosina fosfatasa (PTPs) -las PTPs con dominios SH2: SHP-1 y SHP-2, así como PTP1B- aumenta de modo temprano en el desarrollo de la PA inducida por Cer, y que dicha expresión se ve modulada por algún tipo de MAPK (Sarmiento *et al.*, 2008, 2010). Asimismo, la infiltración causa daño local y sistémico en la enfermedad, y los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos e incluso los linfocitos están implicados en el desarrollo de la PA experimental (Vonlaufen *et al.*, 2007). Por otra parte, los análisis proteómicos de extractos de tejidos procedentes de los modelos animales son una potente herramienta para la obtención de nuevos datos acerca de los procesos biopatológicos de la PA, ya que permiten la identificación de las proteínas específicas cuya expresión se ve alterada durante el desarrollo de la enfermedad. Además, estos análisis pueden desenmascarar nuevos marcadores diagnósticos o pronósticos de la PA, algo muy demandado en la actualidad debido a la ausencia de biomarcadores de uso clínico en dicha patología.

Nuestro grupo de investigación está interesado en conocer y comprender las alteraciones moleculares relacionadas con diversas proteínas lisosómicas, con los

procesos de fosforilación (sobre todo en tirosina) y con el papel de la infiltración, fundamentalmente en la fase más temprana del desarrollo de la PA, apoyándonos en herramientas proteómicas para, eventualmente, desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas de la enfermedad.

De acuerdo con todo lo descrito anteriormente, en esta Tesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar por técnicas proteómicas 2-DE las proteínas pancreáticas solubles y de la fracción subcelular que incluye a los lisosomas, cuyos niveles de expresión se modifiquen en la fase temprana de la PA mediada por Cer.
2. Estudiar los cambios de expresión de la proteína lisosómica LIMP-2 durante la PA-inducida por Cer, así como el efecto que tiene sobre dicha expresión la inhibición de la infiltración, los niveles de AMPc y las MAPKs.
3. Determinar por aproximaciones proteómicas de análisis masivo las proteínas solubles y asociadas a membrana cuyos niveles de expresión varíen durante la fase temprana de la PA mediada por Cer.
4. Analizar las especies de MAPKs que modulan los niveles de expresión de SHP-1, SHP-2 y PTP1B durante la fase temprana de la PA inducida por Cer.
5. Estudiar la influencia de diversos tipos de células inflamatorias en los cambios de expresión de SHP-1, SHP-2 y PTP1B durante la fase temprana de la PA inducida por Cer.
6. Analizar las proteínas solubles y asociadas a membrana cuyos niveles de fosforilación varíen durante la fase temprana de la PA mediada por Cer.
7. Evaluar preliminarmente el uso potencial clínico de algunos de los cambios proteicos y fosfoproteicos detectados en el modelo animal, en relación con la PA que sobreviene a la colangiopancreatografía endoscópica retrógrada.



III. Materiales y Métodos

1. MATERIAL

1.1. Material

- Filtros estériles de 0,2 μm de Pall Corporation.
- Casete de revelado HypercasseteTM de Amersham Pharmacia Biotech.
- Membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de GE Healthcare.
- Película fotográfica Hyperfilm ECL High performance chemiluminescence film de Amersham Biosciences.
- Papel Whatman estándar de Whatman[®].
- Placas de Petri.

Otro material de vidrio y plástico de uso corriente en el laboratorio.

1.2. Material informático

- Adobe Photoshop: procesamiento de imágenes.
- Herramientas bioinformáticas: PANTHER v11.1 (www.pantherdb.org), implementada en el servicio web GO (geneontology.org/page/go-enrichment-analysis); base de datos KEGG PATHWAY, implementada en la herramienta web DAVID v.6.8 (<http://david.ncifcrf.gov/>).
- IBM SPSS Statistics para MS Windows (versión 23.0): análisis estadístico.
- ImageMaster 2D Platinum 7.0.5: programa de análisis de geles 2D.
- Kodak Digital Science v 3.0.
- MacBas 2.5: programa de análisis de las imágenes de transferencias de western.
- Paquete Microsoft Office: redacción del trabajo y elaboración de figuras
- Plataforma EasyProt 2.3: análisis de los datos MS/MS.

1.3. Medios instrumentales

- Agitador balancín BFR 25 de Grant Boekel.
- Agitador magnético Minimix de OVAN.
- Agitador rotatorio modelo Navigator 129 de BioComp.

- Balanza analítica 40SM-200A de Precisa y granataria Electronic Scale de Want.
- Baño termostático Retostat.
- Bomba de vacío.
- Cámara frigorífica a 4º C.
- Centrífugas.
- Congeladores de -20º C y -80º C.
- Equipo de isoelectroenfoque Ettan IPGphor™ de Amersham Biosciences.
- Escáner Hewlett-Packard, modelo Scanjet 3C.
- Escáneres para geles de poliacrilamida: ImageScanner (para tinción de plata) de y Ettan DIGE Imager (para tinciones fluorescentes) de GE Healthcare.
- Espectrofotómetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator.
- Homogeneizador tipo Potter-Elvehjem.
- Lector de ELISA de Thermo Scientific y Varioskan Flash Thermo Electron Corporation.
- Material de disección.
- Máquina de revelado Medical X-ray Processor de Kodak.
- Microscopio óptico Zeiss
- pH-metro Hanna Instruments.
- Sistema de electroforesis vertical Mini-Protean 3 y equipo para transferencia de Western Mini Trans-Blot cell, ambos de Bio-Rad.
- Sistema de electroforesis vertical SE600 Ruby Complete de Bio-Rad.
- Thermoblock (Thermomixer Comfort) de Fisher Scientific.
- Sistema de purificación de agua ultrapura Milli Q (Millipore).
- Transiluminador de luz ultravioleta.
- Unidad de corriente Electrophoresis Power Supply-EPS 601 de GE Healthcare.
- Unidad de corriente Power Pac 300 de Bio-Rad.
- Ultracentrífuga Beckman Optima™ XL-100K.

Otros aparatos de uso frecuente en el laboratorio.

1.4. Reactivos

Todos los productos empleados en este trabajo fueron de calidad analítica. β -mercaptoetanol y azul de bromofenol de Merck. Ceruleína sulfatada seroalbúmina bovina, N`N`N`N`-tetra-metil-etilendiamina (TEMED), cóctel de inhibidores de proteasas (P8340), Sulfato de vinblastina, inhibidor de tripsina, Rolipram, PD98059, SP600125, FK506, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Tween 20 , cloruro de Gadolinium y fosfatasa alcalina, de Sigma. Acrilamida, N,N'-metilén-bis-acrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS) y persulfato amónico (APS) de Bio-Rad; N,N,N',N',-tetrametiletildiamida (TEMED) y kit de enriquecimiento de proteínas ProteoMiner™, fueron adquiridos en BioRad. Iodoacetamida, ditioneitol (DTT), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), IPG-Buffer, parafina, PlusOne™ DryStrip Cover Fluid, glicerol 87%, urea, tiourea, Kit 2D Clean up, tiras Immobiline™ DryStrip de rangos pH 3-5,6, pH 4-7, pH 3-10 (NL) y ECL plus Western blotting detection system, se obtuvieron de GE Healthcare. La retrotranscriptasa "Revert Aid M-MULV RT", la Taq ADN polimerasa, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y el marcador de tamaño de ADN (Gene ruler) se obtuvieron de Fermentas. Los oligonucleótidos se obtuvieron de Isogen. Marcadores Peppermint Stick, ProQ Diamond Gel Stain y Sypro Ruby, de Invitrogen. Page ruler plus prestained protein ladder de Thermo Scientific.

La procedencia de los diferentes anticuerpos empleados a lo largo de este trabajo se recoge en las tablas 4 y 5.

También se usaron diversas soluciones tamponantes de uso cotidiano en el laboratorio y cuya composición se detallará en el apartado correspondiente.

1.5. Animales de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar macho, adultas, de unos 250-280 gramos de peso, proporcionadas por el Servicio de Animalario de la Universidad de Salamanca, donde se mantuvieron a una temperatura de 20-22°C, manteniendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas permanecieron en ayunas, con libre acceso al agua de bebida, 24 horas antes de su sacrificio. En todo momento,

los animales recibieron los cuidados correspondientes de acuerdo con la normativa impuesta por el Consejo de la Comunidad Europea, en relación con la protección de animales utilizados para experimentación y con otros fines científicos y los procedimientos y protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

1.5.1. Grupos experimentales

Los animales se distribuyeron en dos grupos experimentales (con un mínimo de tres individuos por grupo, $n \geq 3$): (1) **grupo pancreatítico**: animales en los que se indujo una PA experimental, (2) **grupo control**: animales no sometidos a la pancreatitis.

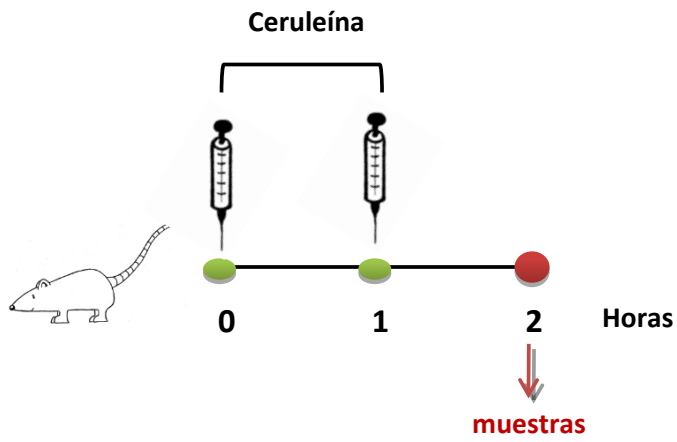
Para llevar a cabo determinados experimentos, algunos animales recibieron pretratamientos con diversos compuestos: SP600125, PD98050, rolipram, sulfato de vinblastina, FK506 y cloruro de Gadolinium, tal y como se describe en apartados posteriores de esta memoria.

2. MÉTODOS

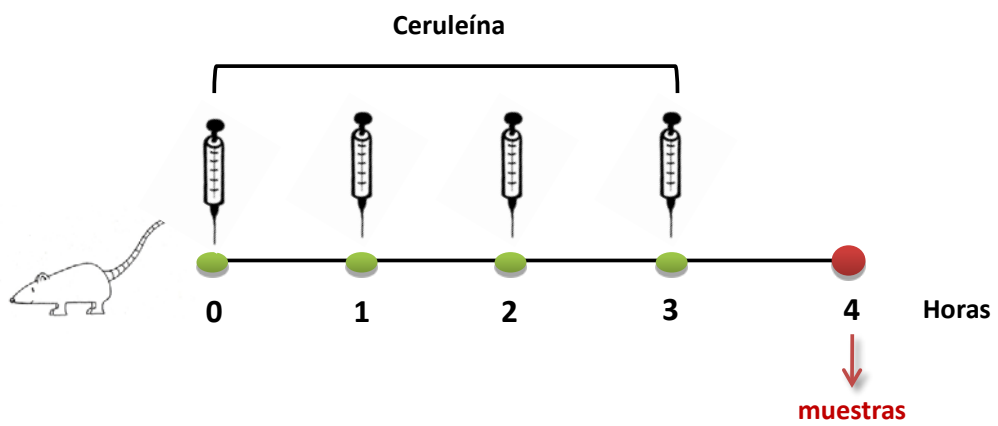
2.1. Inducción de la pancreatitis aguda: modelo por hiperestimulación con ceruleína

La PA se indujo por hiperestimulación con Cer, péptido sintético que simula la actividad biológica de la hormona CCK, según el modelo de Lampel y Kern (1977). La Cer (disuelta en suero fisiológico estéril) se administró por vía subcutánea en dos o cuatro inyecciones sucesivas, a intervalos de 1 hora. La dosis utilizada fue 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$. Los animales control recibieron dosis similares de suero fisiológico estéril. Los animales se sacrificaron a las 2, 4 o 9 horas de la primera inyección por dosis supramáxima de pentobarbital sódico seguida de punción cardíaca. Estos tiempos representan las fases temprana, intermedia y final en las que dividimos arbitrariamente el desarrollo de la PA inducida por Cer (esquema 1).

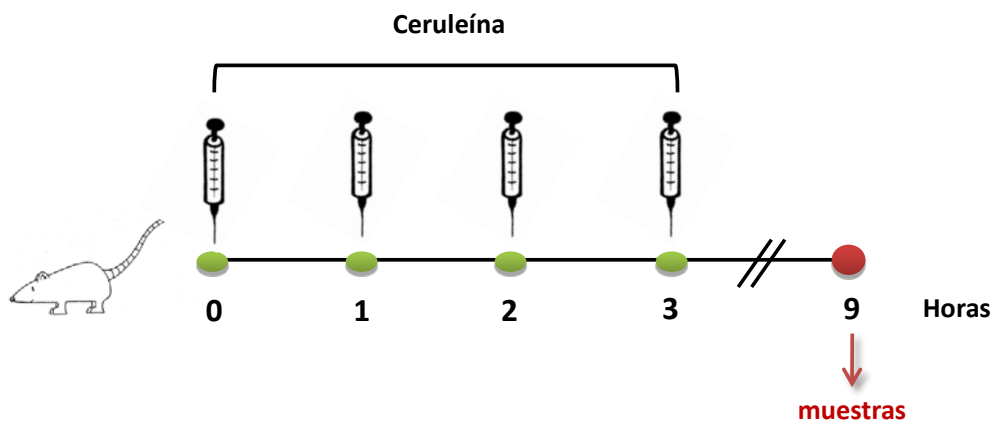
- Fase temprana:



- Fase intermedia:



- Fase final:



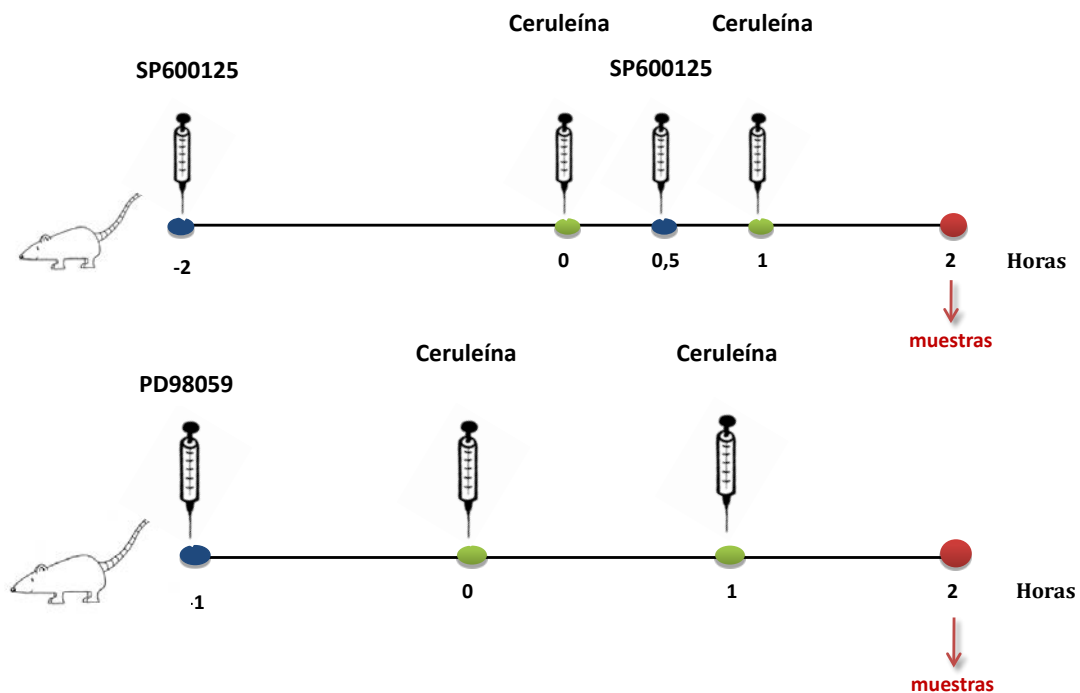
Esquema 1. Inducción de la PA por hiperestimulación con ceruleína.

2.2. Tratamientos

2.2.1. Inhibición de JNK y ERK1/2 por SP600125 y PD98059

Para inhibir las MAPKs JNK y ERK1/2 se emplearon los inhibidores SP600125, que compite con el ATP para inhibir la fosforilación de c-Jun, y PD98059, que inhibe a la MAP quinasa quinasa (MEK)1/2. Las ratas se inyectaron intraperitonealmente con disoluciones de SP600125 (15 mg/kg) o de su vehículo (1 ml/kg de una solución de DMSO al 10% en NaCl) tanto 2 horas antes como 30 minutos después de la primera inyección de Cer siguiendo el método descrito previamente (Minutoli *et al.*, 2004); o bien con disoluciones de PD98059 (5 mg/kg), o de su vehículo (1% Pluronic F-68 en DMSO), 1 hora antes para el PD98059, de la primera inyección de Cer (Namkung *et al.*, 2008). Dos horas o una hora después de la primera inyección de SP600125 o PD98059, respectivamente, las ratas se inyectaron subcutáneamente con Cer o su vehículo (solución salina estéril) en intervalos de 1 hora, como se indica en la sección 2.1. de Métodos, para inducir la PA, dando lugar grupos experimentales indicados en la tabla 1.

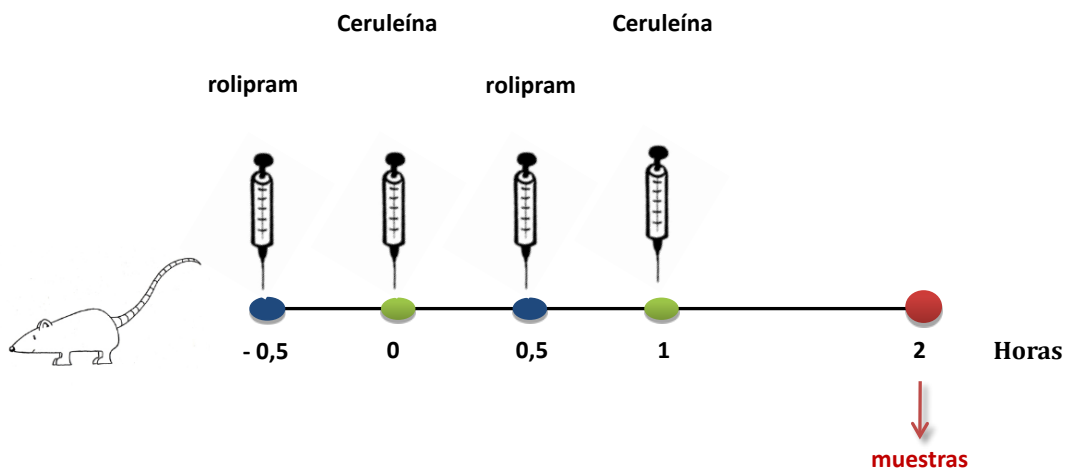
Los animales se sacrificaron 2 horas después de la primera inyección de Cer, representando la fase temprana del desarrollo de la PA inducida por Cer (esquema 2).



Esquema 2. Inhibición de JNK y ERK1/2 por SP600125 y PD98059.

2.2.2. Inhibición de la fosfodiesterasa tipo IV por rolipram

Para inhibir la fosfodiesterasa tipo IV se ha empleado el inhibidor rolipram. Las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con disoluciones de rolipram (5 mg/kg) o de su vehículo (1 ml/kg de una solución de DMSO al 10% en NaCl) tanto 30 minutos antes como 30 minutos después de la primera inyección de Cer, siguiendo el método descrito previamente (Satoh *et al.*, 2000). Treinta minutos después de la primera inyección de rolipram, las ratas se inyectaron subcutáneamente con Cer o su vehículo (solución salina estéril) en intervalos de 1 hora, como se indica en la sección 2.1. de Métodos, para inducir la PA. Los animales se sacrificaron 2 horas después de la primera inyección de Cer, representando la fase temprana del desarrollo de la PA inducida por Cer (esquema 3).



Esquema 3. Inhibición de la fosfodiesterasa tipo IV por rolipram.

2.2.3. Inhibición de células inflamatorias

En ocasiones, se estudió la influencia de diferentes células inflamatorias en la expresión proteica de distintas proteínas, mediante el uso de sulfato de vinblastina, que induce un estado neutropénico; cloruro de Gadolinium ($GdCl_3$), que bloquea la actividad de los macrófagos; o FK506 (tacrolimus), que inhibe la proliferación de los linfocitos T. La neutropenia se indujo mediante la administración intravenosa de sulfato de vinblastina (disuelto en tampón fosfato sódico 10 mM (pH 7,4) que contenía NaCl 147 mM y KCl 2,7 mM) a una dosis de 0,75 mg/kg en el día 1, siguiendo el método descrito

por Clemons *et al.* (2002). A esta dosis, los animales se vuelven neutropénicos entre los días 4 y 6 (Clemons *et al.*, 2002). En el día 5 después de la administración del sulfato de vinblastina o su vehículo (solución salina estéril), los animales fueron tratados con 4 dosis de Cer como se indica en la sección 2.1. de Métodos, y sacrificados inmediatamente, lo que representa la fase intermedia del desarrollo de la PA inducida por Cer. FK506 y GdCl₃ se disolvieron en 1 ml del mismo tampón que el sulfato de vinblastina. Los animales fueron inyectados subcutáneamente con FK506 (0,3mg/kg) 48 horas antes de la inducción de la pancreatitis, en intervalos de 24 horas (Rau *et al.*, 2006). El GdCl₃ se inyectó en la vena de la cola de las ratas 12 h y 1 h antes de la primera administración de Cer (o suero) (Pastor *et al.*, 2006). Algunos animales recibieron simultáneamente el tratamiento con vinblastina y con FK506 o con GdCl₃, dando lugar a los grupos experimentales expuestos en la tabla 1.

La validación del tratamiento se realizó mediante valoración de la actividad mieloperoxidásica, tal y como se describe en el apartado 2.10,1 de esta sección, y mediante el recuento total y diferencial de leucocitos: **recuento total** (expresado por mm³), utilizando una cámara de Neubauer, donde la sangre anticoagulada se mezcló con el reactivo de Turk (dilución 1:20); **recuento diferencial** (expresado como % de los diferentes tipos de leucocitos), utilizando un frotis de sangre periférica teñido con el colorante de Wright.

2.3. Resumen de los grupos experimentales ensayados

Tabla 1. Resumen de los grupos experimentales ensayados.

Fase de la PA (Cer)	Grupo experimental	Grupo experimental
Fase temprana (2 h)	Ceruleína	Suero salino
Fase temprana (2 h)	Ceruleína + SP600125	Ceruleína + vehículo
Fase temprana (2 h)	Suero salino + SP600125	Suero salino + vehículo
Fase temprana (2 h)	Ceruleína + PD98059	Ceruleína + vehículo
Fase temprana (2 h)	Suero salino + PD98059	Suero salino + vehículo

Fase temprana (2 h)	Ceruleína + rolipram	Ceruleína + vehículo
Fase temprana (2 h)	Suero salino + rolipram	Suero salino + vehículo
Fase temprana (4 h)	Ceruleína	Suero salino
Fase temprana (4 h)	Ceruleína + vinblastina sulfato	Ceruleína + vehículo
Fase temprana (4 h)	Ceruleína + GdCl ₃	Ceruleína + vehículo
Fase temprana (4 h)	Ceruleína + FK506	Ceruleína + vehículo
Fase temprana (4 h)	Ceruleína + vinblastina sulfato + GdCl ₃	Ceruleína + vehículo
Fase temprana (4 h)	Ceruleína + vinblastina sulfato + FK506	Ceruleína + vehículo

2.4. Recogida de las muestras de sangre y de páncreas

Las muestras de suero sanguíneo se obtuvieron a partir de la sangre que se obtuvo por punción cardíaca justo antes del sacrificio de los animales, y se utilizaron inmediatamente, o se congelaron y almacenaron en nieve carbónica hasta su uso para la determinación de amilasas séricas. Tras el sacrificio, los páncreas fueron extraídos con la mayor rapidez posible por laparotomía ventral media. A continuación, se colocaron en una placa de Petri con suero fisiológico a 4°C, para retirar el tejido graso circundante, los ganglios linfáticos y los vasos sanguíneos presentes en el órgano. Una vez limpios, se secaron y pesaron. Finalmente, los páncreas se procesaron para obtener las distintas fracciones subcelulares, como se indica en los esquemas 4 y 5. A veces, se separaron secciones de los páncreas para su posterior estudio histológico y para realizar las técnicas de RT-PCR. En ocasiones, los cerebros fueron recogidos para realizar las técnicas de RT-PCR como se indica más adelante (sección 2.7.).

2.5. Aislamiento de las fracciones subcelulares del páncreas

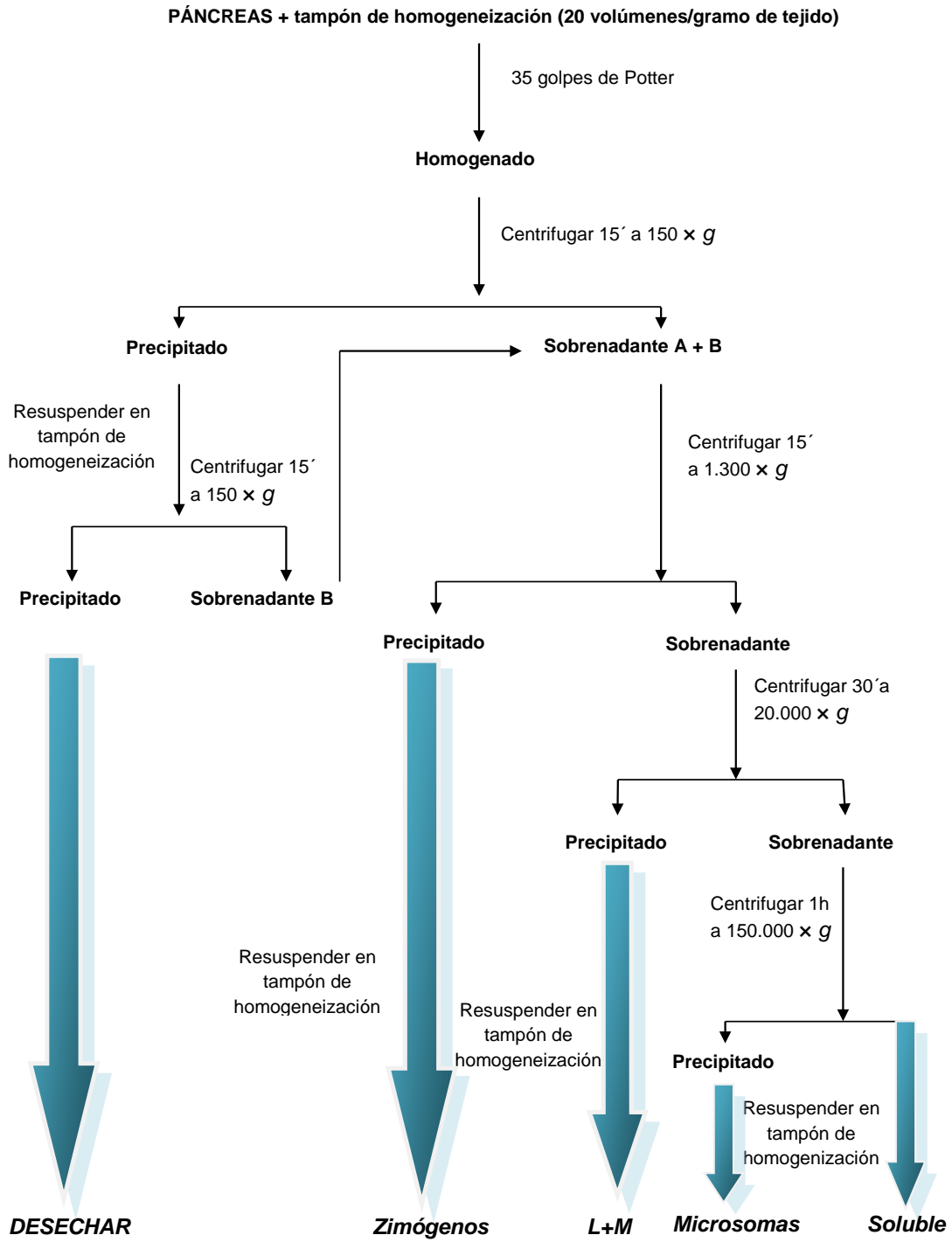
Para la realización de este trabajo de investigación se llevaron a cabo dos protocolos de obtención de fracciones subcelulares del páncreas: uno, en condiciones isotónicas, para el aislamiento de los orgánulos subcelulares del páncreas, a fin de

estudiar de las proteínas relacionadas con la función lisosómica durante la fase temprana de la PA (objetivo 1); otro, para la separación de las proteínas solubles y las asociadas a las membranas celulares del páncreas, a fin de facilitar su estudio proteómico.

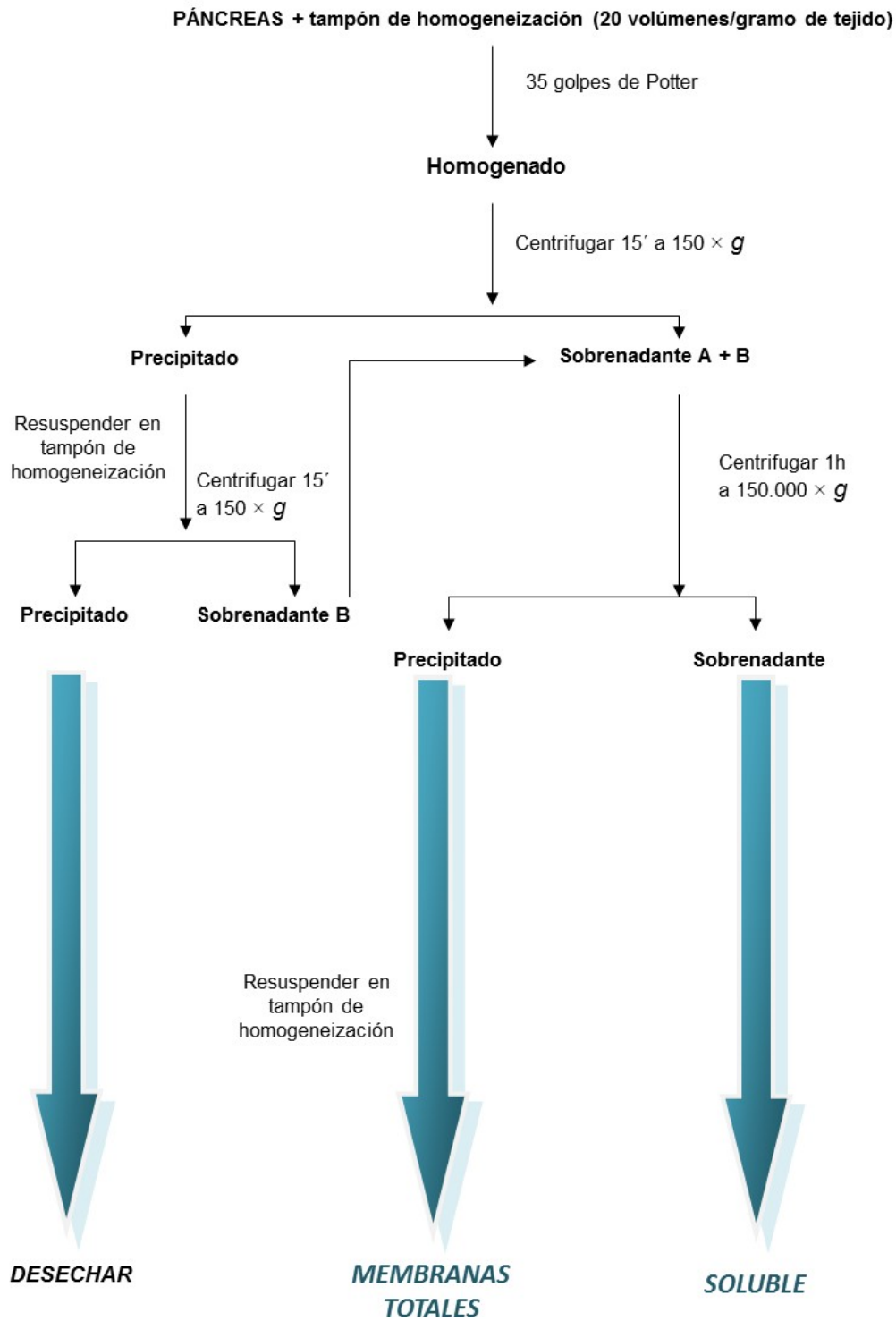
Para la separación de los orgánulos celulares, los páncreas se homogeneizaron en tampón imidazol 3mM (pH 7,4) que contenía sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, ortovanadato sódico 2 mM, PMSF (fluoruro de ortometil fenil sulfonilo) 1 mM, NaF 1mM, TPCK 100 μ M, TLCK 100 μ M, inhibidor de tripsina (10^6 unidades BAEE) y cóctel de inhibidores de proteasas de Sigma (2 μ g/ml de tampón). Para separar las fracciones solubles y de membranas crudas se empleó el mismo tampón en ausencia de sacarosa y con una concentración de imidazol de 5mM (pH 7,4). La homogeneización se realizó en 10 volúmenes de tampón/gramo de tejido, con la ayuda de un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. El homogenado conseguido se centrifugó a 150 \times g durante 15 minutos a 4°C, obteniéndose un precipitado y un sobrenadante (A). El precipitado se resuspendió en 1 ml del tampón de homogeneización y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, obteniéndose un nuevo sobrenadante (B) y un precipitado final, que se desechó. La mezcla de los dos sobrenadantes (A + B) se corresponde con el homogenado postnuclear.

2.5.1. Aislamiento de orgánulos subcelulares (esquema 4)

La mezcla de los dos sobrenadantes se centrifugó a 1.300 \times g durante 15 minutos, lográndose así un precipitado que se resuspendió en el mismo tampón y que correspondía a la fracción subcelular de los zimógenos. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 20.000 \times g durante 30 minutos, obteniéndose un precipitado que se resuspendió en tampón de homogeneización, consiguiéndose así la fracción de lisosomas y mitocondrias (L+M). Por último, el sobrenadante se centrifugó a 150.000 \times g durante 1 hora para obtener un sobrenadante que corresponde a la fracción soluble citosólica del páncreas y un precipitado que se resuspendió con el mismo tampón, obteniéndose así una fracción de microsomas.



Esquema 4. Fraccionamiento subcelular del páncreas de rata en condiciones isotónicas.



Esquema 5. Fraccionamiento subcelular del páncreas de rata para la obtención de las fracciones soluble y enriquecida en membranas totales.

2.5.2. Aislamiento de las fracciones soluble y de membranas totales

El homogenado postnuclear se centrifugó a 150.000×g durante 1 hora a 4°C, lográndose así un sobrenadante, que correspondía a la fracción soluble de páncreas, y un precipitado que correspondía a la fracción enriquecida en membranas totales. La superficie del precipitado se lavó con tampón de homogeneización para minimizar la presencia de restos de la fracción soluble. A continuación, este precipitado se resuspendió en tampón de homogeneización con ayuda de vórtex, se añadió N₂ y se almacenó toda una noche en hielo y a 4°C. A la mañana siguiente se añadió el mismo volumen de tampón de homogeneización y se pasó por el Dounce (esquema 5).

Las muestras se mantuvieron entre hielo durante todo el aislamiento y después se almacenaron a -80°C, en atmósfera de N₂, hasta su utilización.

2.6. Valoración histológica del páncreas

La valoración histológica del páncreas se realizó por observación a microscopía óptica. Se separaron pequeños trozos de páncreas a diferentes tiempos (2, 4 y 9 horas) después de la inducción de la PA inducida por Cer o de animales control, y se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino 0,15 M, pH 7,2 durante 48 horas a 4°C. Posteriormente, se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol (50-100%), se lavaron con xileno y se incluyeron en parafina. Se montaron secciones de 10 µm de grosor en portas recubiertos de gelatina, que se desparafinaron, hidrataron y tiñeron con hematoxilina y eoxina para su observación. Estas técnicas se llevaron a cabo con la colaboración del Dr. Arturo Mangas en el Departamento de Biología Celular y Patología de nuestra Universidad, y la valoración histológica la llevó a cabo el Dr. Rafael Coveñas del mismo departamento.

2.7. RT-PCR semicuantitativa

Los experimentos de RT-PCR fueron realizados en el laboratorio del Dr. Ángel Hernández Hernández.

2.7.1. Obtención del ARN

El ARN total se obtuvo a partir de secciones de los páncreas y cerebros de ratas control y pancreatíticas representativas de la fase temprana de la PA inducida por Cer. Se empleó el reactivo TRI reagent de SIGMA siguiendo las instrucciones de la casa comercial para la extracción. Se incubaron homogenados de las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 0,2 ml de cloroformo y se agitaron los tubos durante 15 segundos. Se incubaron de nuevo a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y se centrifugaron a 12.000×g durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, la fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio y se añadieron 0,5 ml de isopropanol, incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugaron a 12.000×g durante 10 minutos a 4°C para precipitar el ARN. El ARN se sometió a un lavado con 1 ml de etanol al 75% y se volvió a centrifugar a 7.500×g durante 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el precipitado y se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM, pH 7,5). La concentración de ARN se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro GeneQuant pro RNA/DNA Calculator. La integridad del ARN se comprobó corriendo 1 µg de ARN en geles de agarosa.

2.7.2. Síntesis del ADN copia (ADNc) y reacción de PCR

La síntesis del ADNc se llevó a cabo incubando 2 µg del ARN total con 0,5 µg de 18-mer oligo-dT a 42°C durante 1 hora, utilizando 200 U de la retrotranscriptasa (RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase) en una solución que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM, dNTPs individuales 1 mM y 20 U del inhibidor de Ribonucleasa en un volumen final de 20 µl. Se dejó transcurrir la reacción durante 1 hora a 37°C y se paró calentando la mezcla a 70°C durante 10 minutos. Después, 4 µl de esta reacción se utilizaron para la reacción de PCR, que se llevó a cabo en un volumen final de 40 µl, conteniendo 1 U de Taq polimerasa y 0,4 µM de los oligonucleótidos específicos. Para estar seguros de que trabajábamos en condiciones semicuantitativas, a partir del ADNc se realizó la reacción de PCR con distinto número de ciclos, comprobando que tanto el aumento de la cantidad de ARN como el aumento del número de ciclos reflejaba un aumento de la cantidad de ADN obtenido en la PCR.

Se emplearon 25, 29, 32 y 35 ciclos y la temperatura de hibridación fue de 54°C. Se realizó la PCR a partir del mismo ADNc para dos genes: Limp-2 y β -Actina (empleado como control de carga). Cada ciclo de la PCR consistió en un paso de desnaturalización (1 minuto a 95°C), un paso de hibridación (1 minuto a la temperatura adecuada a cada pareja de oligonucleótidos) y un paso de amplificación (1 minuto a 72°C).

Las secuencias de los oligos empleados fueron las siguientes:

1. **Limp-2:**

Oligo sentido: 5'-ATA AAA GGC ATG CGT CCA AAC AAG G-3'

Oligo antisentido: 5'-TGC TGC GGC TTC ACT CCC TTC T-3'

Tamaño del amplicón: 507 pb.

2. **β -Actina:**

Oligo sentido: GATCTGGCACCCTCTTCTACAAT.

Oligo antisentido: GCCACATAGCACAGCTTCTCCTTGA.

Tamaño del amplicón: 438 pb.

2.8. Electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica consiste en separar los fragmentos de ADN en función de su tamaño. Para la preparación de los geles se realizó una disolución de agarosa al 1% en TAE (Tris-Acético-EDTA: Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 2 mM) a la cual se añadieron 1-3 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) por cada 50 ml de gel, dejándose solidificar a temperatura ambiente. Las muestras se cargaron en los geles mezcladas con tampón de carga 10X. La electroforesis se realizó a 100 V (geles de 50 ml) usando el tampón TAE como tampón de electroforesis. Las imágenes de los geles se obtuvieron sobre un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a una cámara Kodak GL 100, y se procesaron mediante el programa Kodak Digital Science v 3.0.

2.9. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las diversas fracciones subcelulares se valoró por el método de Bradford (1976). Tanto las muestras como el patrón se diluyeron con NaOH 0,5 N antes de las determinaciones. El patrón utilizado fue seroalbúmina bovina (BSA).

2.10. Determinación de actividades enzimática

2.10.1. Determinación de la actividad mieloperoxidásica

La actividad mieloperoxidásica se valoró mediante el uso del kit comercial MPO Fluorometric Detection Kit (Assay Design, Stressgene, Enzo Life Sciences, Madrid, España) siguiendo exactamente las indicaciones del fabricante.

2.10.2. Determinación de la actividad amilásica sérica

La actividad amilásica sérica se valoró en un Autoanalizador de Bioquímica Gernon Star usando el kit comercial Alfa Amilasa Liquicolor (RAL, Técnica para el Laboratorio, S.A., Barcelona, España) en el Servicio de Bioquímica del Hospital Fundación Santísima Trinidad de Salamanca, siguiendo el protocolo estandarizado que se lleva a cabo en dicho Servicio, con la colaboración del Dr. Jesús Hueso.

2.11. Técnicas proteómicas

Para caracterizar los cambios que ocurren a nivel proteico durante la fase temprana de nuestro modelo de PA, analizamos diferentes fracciones subcelulares mediante tres tipos de técnicas proteómicas, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Técnicas proteómicas utilizada en el análisis de fracciones subcelulares del páncreas de rata en la fase temprana de la PA inducida por Cer.

Técnica proteómica	Fracción	Estudio
Electroforesis bidimensional (2-DE)	Soluble	Proteoma, rango ácido
	L+M	Proteoma, rango ácido
	Soluble	Fosfoproteoma, rango ácido - neutro
Marcado isobárico (TMT ⁶) combinado con LC-MS/MS	Soluble	Proteoma
	Membranas totales	Proteoma
Marcado isobárico (TMT ⁶) combinado con LC-MS/MS, enriquecimiento con TiO ₂	Soluble	Fosfoproteoma
	Membranas totales	Fosfoproteoma

2.11.1. Electroforesis bidimensional (2-DE)

Los extractos proteicos procedentes de las fracciones subcelulares solubles y enriquecida en lisosomas y mitocondrias (L+M) se sometieron a separación por electroforesis bidimensional para su estudio proteómico.

2.11.1.1. Solubilización de la muestra

Las muestras procedentes de la fracción L+M, obtenida como se indicó en la sección 2.5.1, requieren un paso previo de solubilización para favorecer su enfoque y posterior separación electroforética, debido a su contenido en proteínas de membrana.

Para ello, el volumen de muestra correspondiente a la cantidad de proteína que se deseaba solubilizar, se mezcló con un volumen equivalente de tampón de homogeneización (composición detallada en la sección 2.5 de Materiales y Métodos)

suplementado con SDS 4% (v/v) y DTT 120 mM. Tras agitación en vórtex, la mezcla se incubó a 100°C durante 8 minutos para favorecer la solubilización de las proteínas. A continuación, las muestras se centrifugaron a 15.700×g, durante 5 minutos, a temperatura ambiente y los sobrenadantes obtenidos se recogieron para su posterior análisis.

2.11.1.2. Preparación de la muestra

Las fracciones subcelulares solubles, así como las proteínas previamente solubilizadas de la fracción L+M, se trataron con 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare Life Sciences), siguiendo las indicaciones del fabricante, a fin de eliminar la posible presencia de contaminantes como sales, lípidos, ácidos nucleicos y detergentes, que podrían distorsionar la separación proteica. Las muestras destinadas a IEF contenían 100 µg de proteínas en el caso de los geles analíticos y 700-1000 µg en los geles preparativos (de los que se extrajeron las manchas de proteínas (spots) analizadas por espectrometría de masas). El precipitado obtenido con las proteínas purificadas se resuspendió durante 20 minutos a temperatura ambiente en 340 µl de un tampón de rehidratación de carácter marcadamente desnaturizante (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% (p/v), DTT 50mM, anfolitos transportadores de rango de pH 3,5-5 o pH 4-7 0,5% (p/v) (IPG buffer, GE Healthcare Life Sciences) y trazas de azul de bromofenol).

2.11.1.3. Primera dimensión: isoelectroenfoque (IEF)

La separación de proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI) se realizó en tiras Immobiline™ DryStrip de 180 x 3 x 0,5 mm (GE Healthcare). Para el estudio de las fracciones citosólica y enriquecida en L+M se utilizaron tiras de un rango de pH 3-5,6 no lineal; las proteínas procedentes de la fracción soluble del páncreas se enfocaron en tiras de rango de pH 4-7, lineal. Los 350 µl de proteínas diluidas en tampón de rehidratación se dispusieron en el interior de un sarcófago de IEF, colocando sobre ella la tira de forma que el gel contactara directamente con la muestra. Tras unos segundos de impregnación, la tira se cubrió con parafina (PlusOne™ Dry StripCover Fluid) para evitar la cristalización de la urea y la evaporación de la solución.

El IEF se efectuó en una unidad Etton IPGphor™ (GE Healthcare) bajo las siguientes condiciones: (a) rehidratación activa durante 12 horas (Rabilloud *et al.*, 1994): (i) 30V, 6 horas; (ii) 60V, 6 horas; (b) isoelectroenfoco: (i) 500V, 1 hora; (ii) 1000V, 1 hora; (iii) gradiente hasta 8000V, 30 minutos; (iv) 8000V, 6 horas y 15 minutos; (v) etapa final de mantenimiento a 500V para evitar la deriva de las proteínas enfocadas, hasta alcanzar un voltaje total de aproximadamente 55.000VhT. La temperatura se fijó a 20°C y la corriente a un máximo de 50 µA por tira.

2.11.1.4. Equilibrado de las tiras

Después del IEF, las tiras deben equilibrarse con un tampón específico antes de ser utilizadas en la segunda dimensión (Yan *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2004). Para ello, las tiras se incubaron, en agitación constante, durante 15 minutos en 5 ml de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), DTT 2% (p/v) y una traza de azul de bromofenol. Esta incubación se repitió nuevamente durante otros 15 minutos con el mismo tampón anterior, pero conteniendo 2,5% (p/v) de iodoacetamida en vez de DTT. El DTT es un agente reductor que rompe los enlaces disulfuro de la muestra y la iodoacetamida se encarga de estabilizar los grupos -SH generados, evitando su reoxidación durante la electroforesis y facilitando, en combinación con el SDS y la urea, la desnaturalización proteica (Shaw and Riederer, 2003). El glicerol reduce los fenómenos de electroendósmosis y mejora la transferencia de las proteínas de la primera a la segunda dimensión.

2.11.1.5. Segunda dimensión: electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas en la segunda dimensión consistió en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) realizada en geles caseros de poliacrilamida de tamaño 16 cm x 16 cm x 1 mm al 10% (tiras de pH 3-5,6) o 16 cm x 16 cm x 1,5 mm al 12% (tiras de pH 4-7). La concentración de acrilamida se determinó experimentalmente según el perfil proteico de cada condición. Los geles destinados a tinción con *Pro Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain* necesitaron de un mayor grosor

para aportar resistencia ante los múltiples pasos de lavado e incubación durante la tinción. Las tiras equilibradas se colocaron sobre la parte superior de los geles verticales, sellando la unión con una mezcla de agarosa 0,5% (v/v), traza de azul de bromofenol, en tampón de electroforesis. Adicionalmente, sobre un extremo de los geles destinados a estudios de fosforilación se dipuso una porción de papel de Whatman® estándar de 3 x 3 mm impregnada con 5 µl de marcadores de peso molecular *Peppermint-Stick phosphoprotein molecular weight standards* (Invitrogen), compuestos por una mezcla de proteínas fosforiladas y no fosforiladas.

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en un equipo SE600 Ruby con sistema de refrigeración por agua (Hochstrasser *et al.*, 1988). Las condiciones de la electroforesis fueron: (i) 15mA/gel constantes durante 30 minutos para la correcta penetración de la muestra de la tira al gel SDS-PAGE; (ii) 35mA/gel constantes hasta la llegada del frente de electroforesis al final del gel.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se incubaron en las soluciones de fijación adecuadas según su posterior tinción.

2.11.1.6. Tinción de los geles 2D

Durante todo el proceso se utilizaron guantes sin polvos de talco para evitar su reacción con los reactivos de tinción, lo que perturbaría el revelado del gel.

2.11.1.6.1. Detección de fosfoproteínas por tinción fluorescente (Pro-Q Diamond Gel Stain)

Después de la electroforesis, los geles bidimensionales correspondientes a la fracción subcelular soluble se tiñeron con el reactivo fluorescente Pro-Q Diamond (Invitrogen) para la detección de fosfoproteínas. Se siguieron las instrucciones del fabricante, prestando especial atención en mantener las condiciones de temperatura y tiempos de incubación constantes a fin de optimizar la reproducibilidad de los mapas fosfoproteicos.

Las diferentes etapas del protocolo de tinción se realizaron en agitación orbital constante.

- (i) Fijación: los geles 2D se fijaron en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%, en dos pasos consecutivos: (a) una primera incubación de 30 minutos para eliminar el SDS remanente de la electroforesis; (b) seguida de una incubación durante toda la noche para completar la fijación proteica.
- (ii) Lavados en agua ultrapura: 3 lavados de 15 minutos cada uno, destinados a eliminar los restos de metanol y ácido acético que podrían interferir con la reacción de tinción.
- (iii) Incubación con el reactivo Pro-Q Diamond: los geles se incubaron en oscuridad durante 1 hora y 30 minutos (volumen de tinción nuevo; primera réplica de cada muestra) o 1 hora y 45 minutos (volumen de tinción reutilizado; segunda réplica de cada muestra).
- (iv) Desteñir: tras la incubación con el reactivo fluorescente, es necesario desteñir para reducir la señal del fondo y los posibles marcajes inespecíficos. Para ello, los geles se incuban en una solución de acetato sódico 1M al 5% (v/v) (pH 4,0), acetonitrilo 20%, con 3 cambios de 30 minutos, en oscuridad.
- (v) Lavados en agua ultrapura: 3 lavados de 10 minutos cada uno.

Los geles teñidos se almacenaron a 4º C en agua ultrapura protegidos de la luz hasta su posterior escaneado. Una vez digitalizados, los geles se tiñeron con el reactivo Sypro Ruby y se escanearon de nuevo para la detección de proteínas totales.

2.11.1.6.2. Detección de proteínas totales por tinción fluorescente (Sypro Ruby Gel Stain)

Los geles bidimensionales preparativos, así como los geles previamente teñidos con Pro-Q Diamond, se tiñeron con el reactivo fluorescente SYPRO Ruby (Invitrogen) para la detección de proteínas totales, según las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, (i) los geles se fijaron durante 30 minutos en una solución de metanol 50%, ácido acético 7%, salvo en el caso de los geles previamente teñidos con Pro-Q Diamond; (ii) la incubación con el reactivo SYPRO Ruby se realizó durante toda la noche en

condiciones de oscuridad. (iii) finalmente, los geles 2D se destiñeron para optimizar la relación señal/fondo en dos lavados sucesivos de metanol 10%, ácido acético 7%; (iv) tras dos lavados finales de 10 minutos en agua ultra pura, los geles se almacenan a 4º C y protegidos de la luz hasta su escaneo.

2.11.1.6.3. Detección de proteínas totales por tinción de nitrato de plata

La tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante del kit Silver Staining kit, Protein (GE Healthcare).

2.11.1.7. Digitalización de los geles 2D

Las imágenes de los geles teñidos con reactivos fluorescentes se adquirieron en un escáner Ettan DIGE Imager (GE Healthcare), con la colaboración del Dr. Fernando Sánchez Juanes, a las longitudes de onda indicadas en la tabla 3. Los tiempos de exposición seleccionados para la adquisición de las imágenes de geles teñidos con Pro-Q Diamond se optimizaron experimentalmente para cada gel en base a la señal de los marcadores fosforilados y no fosforilados (PeppermintStick phosphoprotein molecular weight standards, Invitrogen) resueltos en un extremo del gel durante la segunda dimensión. Estos marcadores también se emplearon como referencia para determinar el tamaño molecular relativo de cada proteína en su gel.

Tabla 3. Longitudes de onda de excitación y emisión de los reactivos fluorescentes para tinción de proteínas.

Tinción	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)	Canal en Ettan DIGE Imager
Pro-Q Diamond	540	595	Deep Purple 2
Sypro Ruby	390	595	Sypro Ruby 1

Los geles 2D teñidos con plata se digitalizaron usando el dispositivo Image Scanner (GE Healthcare), con una resolución de 600 dpi (dots per inch).

2.11.1.8. Análisis de imagen

Para el procesamiento y análisis estadístico de las imágenes adquiridas se empleó el software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Amersham Bioscience). Las imágenes digitalizadas fueron ligeramente recortadas antes de ser detectadas. Una vez restado el fondo y ajustado el umbral de detección para eliminar artefactos, la discriminación de spots se realizó bajo los siguientes parámetros: (i) smooth factor: 2; (ii) área mínima: 5 píxeles; (iii) saliencia: 60 (Pro-Q Diamond) o 100 (SYPRO Ruby y tinción con nitrato de plata). Sobre las imágenes detectadas se efectuó una edición manual para la eliminación de artefactos aún considerados por el programa como spots.

Para poder analizar los geles, es necesario un primer paso de alineamiento o *matching* de los mapas bidimensionales, tanto intra como intergrupales. El alineamiento consiste en el apareamiento del mismo spot proteico en los diferentes geles en los que esté representado, y su funcionamiento se basa en la asignación de unas coordenadas X e Y para cada uno de los puntos detectados en un gel y la correspondencia de las mismas en los restantes geles. Inicialmente, se eligió un gel de referencia en cada grupo (control y pancreatítico) con respecto al que alinear y comparar los spots de proteínas de otros geles; en cada caso se escogió como gel de referencia aquel que presentara mejor calidad resolutive y mayor número de spots. Frente a este mapa se llevó a cabo el alineamiento y reconocimiento de las especies proteicas comunes en un determinado grupo. En primer lugar, se introdujeron marcas de posicionamiento o *landmarks* (spot bien definido y fácilmente reconocible, presente en todos los geles), que el programa utiliza como coordenadas de referencia para el alineamiento.

Una vez realizado el alineamiento intragrupal, se procedió al alineamiento intergrupales, introduciendo nuevamente *landmarks* presentes en los geles de referencia de ambos grupos. El software realiza un alineamiento de los geles de referencia de cada grupo entre sí, extendiéndolo automáticamente al resto de geles de cada grupo. El alineamiento final entre los diferentes geles se verificó manualmente, y la calidad de los spots considerados para su análisis se examinó mediante la herramienta de visión tridimensional.

El volumen de cada spot individual se normalizó con respecto al volumen total de todos los spots detectados del gel, obteniendo el volumen relativo o normalizado de cada spot (% de volumen; volumen de cada spot individual dividido por el volumen total de todos los spots del gel y multiplicado por 100), que fue el valor utilizado para el análisis estadístico. Los niveles de expresión o fosforilación proteica se aproximaron mediante el volumen relativo de cada spot.

En los estudios de fosforilación proteica, para identificar de forma unívoca la alteración a nivel de fosforilación, se calculó la relación entre el volumen relativo obtenido con la señal Pro-Q Diamond (D) y el obtenido para el mismo spot con la señal SYPRO Ruby (S), de forma que solamente aquellos spots con cocientes D/S superiores a 3 se consideraron como señales específicas de fosfoproteínas. Este valor umbral se determinó experimentalmente mediante al análisis de los cocientes D/S de los marcadores de peso molecular fosforilados y no fosforilados, resueltos en diferentes geles 2D.

Las especies proteicas cuyos niveles de expresión o fosforilación (en términos de volumen relativo) presentaran diferencias de tres o más veces en las ratas tratadas con Cer en comparación con las control, así como las que aparecían o desaparecían, estando presentes en al menos la mitad más uno de los geles analizados por grupo, y además superaran el test t de Student ($p < 0,05$) fueron seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas.

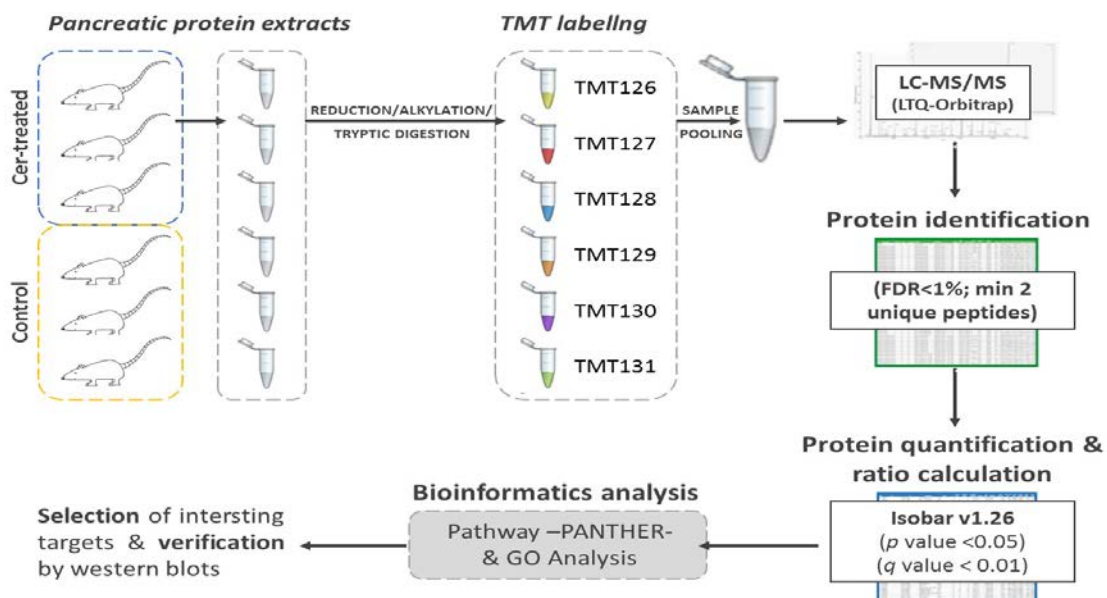
2.11.1.9. Identificación y clasificación proteica

La extracción de las proteínas seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas se realizó a partir de geles cargados con 700-1000 μg de proteínas, teñidos con Sypro Ruby O Pro-Q Diamond. Durante todo el proceso de electroforesis se extremaron las precauciones, trabajando en todo momento con guantes y mascarilla, para evitar cualquier tipo de contaminación proteica externa (como por ejemplo la producida por las queratinas de la piel). Las proteínas se extrajeron de forma manual, con un bisturí estéril, a partir del gel teñido y todos los fragmentos se guardaron en agua ultrapura hasta su envío al Servicio de Proteómica del Centro

Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) (Madrid), donde se realizaron los estudios de espectrometría de masas y la identificación de las proteínas por la técnica de MALDI-TOF/TOF MS (la descripción del método de identificación proteica se detalla en el primer capítulo de Resultados). Se consideraron correctas las identificaciones con una puntuación individual (score) de proteínas superior a 80 y un p valor inferior a 0.05.

2.11.2. Proteómica cuantitativa *shotgun*: Marcaje isobárico TMT combinado con LC-MS/MS

El análisis proteómico cuantitativo mediante marcaje isobárico TMT⁶ y LC-MS/MS se realizó siguiendo el método descrito por Dayon y Sanchez (2012). Para ello, se seleccionaron de forma aleatoria 3 muestras control y 3 muestras pancreáticas procedentes de las fracciones soluble y asociada a membranas del páncreas de rata, durante la fase temprana de la PA inducida por Cer, que se analizaron en dos experimentos independientes. Todos los detalles metodológicos se explican detenidamente en tercer apartado de Resultados.



Esquema 6. Flujo de trabajo del análisis proteómico a gran escala mediante marcaje TMT6 plex combinado con LC-MS/MS. Adaptado de Tiberti y Sanchez (2015).

2.11.3. Fosfoproteómica cuantitativa shotgun: marcado isobárico TMT con enriquecimiento de fosfopéptidos, combinado con LC-MS/MS

Para llevar a cabo el análisis fosfoproteómico masivo del páncreas durante la fase temprana de la PA inducida por Cer, utilizamos 3 muestras control y 3 muestras pancreáticas procedentes de los mismos animales seleccionados para el análisis de expresión total.

Los volúmenes de muestra a tratar se enviaron liofilizados y en nieve carbónica al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) (Madrid), donde se realizó el análisis fosfoproteómico.

2.11.3.1. Precipitación de proteínas, digestión enzimática y marcado por TMT⁶plex

Tres muestras control y 3 muestras pancreáticas, tanto de la fracción soluble como de la fracción de membranas totales, se analizaron en dos experimentos TMT⁶plex independientes.

Ochenta µg de proteínas de cada una de las muestras se precipitaron con metanol/cloroformo y se disolvieron en un tampón de condiciones desnaturalizantes (TEAM 0,1M (pH 7,5), Urea 7M, Tiourea 2M). A continuación, las proteínas se redujeron con TCEP 50 mM (pH 8.0) (60 minutos a 37°C), se alquilaron con metanotiosulfonato de metilo (MMTS) 200mM (10 minutos a temperatura ambiente) y se digirieron mediante la adición de tripsina (Sigma-Aldrich) en una proporción tripsina-proteína de 1:20 (O/N a 37°C). Los péptidos trípticos resultantes de la digestión de cada muestra se marcaron con uno de los reactivos TMT de la versión sixplex (Thermo Scientific). Tanto para la fracción soluble como para la fracción enriquecida en membranas, las muestras control se marcaron con las etiquetas 126, 128 y 130, mientras que las pancreáticas se marcaron con las etiquetas 127, 129 y 131.

Tras el marcaje, las seis muestras del mismo experimento TMT se combinaron en una sola y se desalaron en una columna SEP-PAK C18 (Waters). Por último, los péptidos purificados se desecaron y se almacenaron a -20°C para su análisis posterior.

2.11.3.2. Enriquecimiento de fosfopéptidos con dióxido de titanio (TiO₂)

Las mezclas peptídicas marcadas se dividieron en tres alícuotas para optimizar la purificación de los fosfopéptidos. Los péptidos se cargaron en una resina de dióxido de titanio (TiO₂) en presencia de ácido glicólico (ácido glicólico 1M en acetonitrilo al 80% y ácido trifluoroacético (TFA) al 1%). Este ambiente marcadamente ácido favorece la selectividad de la resina por los fosfopéptidos al reducir la unión inespecífica de péptidos no fosforilados, por lo que resulta especialmente útil para estudios fosfoproteómicos a gran escala. Posteriormente, los fosfopéptidos unidos al TiO₂ se eluyeron mediante el uso de un tampón alcalino. Como resultado de esta etapa de enriquecimiento obtuvimos dos fracciones: el eluido resultante de las tres fracciones iniciales (fracción fosforilada) y el material no unido a la resina o *flow-through* (fracción no fosforilada).

Después del enriquecimiento, la fracción enriquecida en fosfopéptidos se purificó en una micro-columna casera Oligo R3 de fase reversa y la fracción no unida, en una columna SEP-PAK C18. Finalmente, las muestras se desecaron de nuevo antes del análisis por espectrometría de masas.

2.11.3.3. Análisis por LC-MS/MS

Las dos fracciones (unida y no unida) resultantes del enriquecimiento de fosfopéptidos se sometieron al análisis LC-MS/MS en un sistema de nano cromatografía líquida (Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1Dplus, AB SCIEX) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Triple TOF 5600 (AB SCIEX) con ionización por nanoelectrospray. Se decidió analizar ambas fracciones – fosforilada y no fosforilada- para garantizar que hubiera un conjunto de proteínas de fondo sin regulación diferencial en fosforilación que permitiera garantizar la solidez del tratamiento estadístico de los datos.

Los iones se atraparon en una columna cromatográfica C18 PepMap (5 µm, 100 µm I.D. x 2 cm, Thermo Scientific) a 2 µL/min, en ácido fórmico al 0.1% en agua.

Los solventes de elución utilizados fueron los siguientes: (i) A (ácido fórmico al 0.1% en agua) como fase móvil para el equilibrado; (ii) B (ácido fórmico al 1% en

acetonitrilo) como solvente para la elución. Los péptidos se eluyeron a 250 nl/min en una gradiente lineal de 220 minutos desde un 5% hasta un 40% de solvente B. Los péptidos trípticos fueron detectados primero como iones m/z en un rango de 300-1250 m/z y, posteriormente se tomaron los 35 iones precursores más intensos, de los que se obtuvieron los espectros de fragmentación MS/MS para su identificación.

2.11.3.4. Identificación de péptidos y proteínas

Los espectros MS/MS obtenidos se exportaron a formato mgf mediante la herramienta Peak View v1.2.0.3. Para la identificación peptídica y proteica, se empleó una combinación de motores de búsqueda (Mascot Server 2.5.1., OMSSA 2.1.9, X!TANDEM 2013.02.01.1 y Myrimatch 2.2.140), que utilizan bases de datos target-decoy construidas a partir de secuencias del proteoma de referencia *Rattus norvegicus* recogidas en la base de datos UniProt Knowledgebase (Abril, 2016). Los espectros de fragmentación experimentales se comparan sobre estas bases target-decoy, obteniéndose distintas puntuaciones (scores) individuales que, posteriormente y con la aplicación de un algoritmo desarrollado, generan un “metascore” mejorado (Ramos-Fernández *et al.*, 2008).

Los parámetros de búsqueda seleccionados fueron los siguientes: a) Taxonomía: *Rattus norvegicus*; b) Enzima proteolítica: tripsina (2 errores de corte o *misscleavage* tolerados); c) *Mass error tolerance*: 25 ppm; d) *Fragment ion tolerance*: 0.02 Da; e) Modificaciones fijas: TMT⁶ N-terminal, TMT⁶ en lisinas, modificación MMTS de cisteínas; f) Modificaciones variables: oxidación de metioninas, acetilación N-terminal.

Para continuar con el análisis cuantitativo, únicamente se consideraron aquellos péptidos con una tasa FDR (*False Discovery Rate*) inferior a 0.01.

2.11.3.5. Cuantificación proteómica relativa

El procesamiento y análisis estadístico de los datos proteómicos se efectuó mediante software procedente de Proteobotics S.L. (Madrid, Spain). Los niveles de regulación diferencial se calcularon a partir de modelos lineales (Lopez-Serra *et al.*,

2014), y la significación estadística se calculó a partir de q-valores (FDR), considerando que existía regulación diferencial para q-valor <0.05. El valor q representa la proporción esperada de falsos positivos que obtendríamos si consideramos significativo un umbral de p-valor igual o inferior al correspondiente para esa medida.

2.12. Análisis de la expresión o fosforilación de proteínas mediante transferencia de Western

La expresión o fosforilación de diversas proteínas de interés se analizó en las distintas situaciones experimentales mediante transferencia de Western. Como control de carga, en los extractos soluble y de homogenado postnuclear se analizó la expresión de GAPDH utilizando el anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (Ambion, AM4300); en el caso de las proteínas asociadas a la fracción de membranas y de los plasmas de pacientes sometidos a CPRE, ante la ausencia de una proteína constitutiva adecuada para la normalización, se utilizó como control de carga la tinción con Rojo Ponceau S de la membrana PVDF tras la transferencia.

2.12.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos procedentes de las diferentes muestras se sometieron a electroforesis desnaturante en condiciones reductoras, siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se incubaron a 100°C durante 5 minutos en tampón de carga (Tris-HCl 125 mM, que contenía SDS al 2% (p/v), glicerol al 5% (v/v), azul de bromofenol 0,003% (p/v) y β -mercaptoetanol al 1% (v/v) pH 6,8). Las electroforesis se efectuaron en una disolución amortiguadora (tampón de electroforesis), aplicándose un voltaje constante de 125 V a temperatura ambiente.

2.12.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida Mn²⁺ Phos-tag en presencia de SDS (Phos-tag SDS-PAGE)

Las diferentes muestras proteicas tratadas con tampón de carga se separaron en geles Mn²⁺-Phos-tag desnaturizantes en condiciones reductoras, siguiendo el método de Kinoshita et al. (2006). Los geles SDS-PAGE se copolimerizaron con el reactivo Phos-tag (Wako) (25–100 µM) en presencia de Mn²⁺ (50–200 µM). La concentración óptima de Mn²⁺-Phos-tag se determinó experimentalmente para cada inmunodetección. La electroforesis se efectuó a una intensidad constante de 8 mA/gel, manteniendo el sistema refrigerado a una temperatura de alrededor de 15°C. El resto del procedimiento fue equivalente al de una electroforesis SDS-PAGE convencional.

Después de la electroforesis, los geles se incubaron en tampón de transferencia sin metanol, suplementado con EDTA 1mM (6 lavados de 10 min) o con EDTA 10mM (2 lavados de 10 min) para favorecer la migración de las proteínas del gel Phos-tag a la membrana durante la transferencia.

2.12.3. Transferencia de las proteínas a la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)

Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. Para ello se empleó un sistema de transferencia húmedo utilizando una disolución amortiguadora (tampón de transferencia) de Tris-HCl 25 mM, con glicina 190 mM y metanol al 20% (SDS-PAGE convencional) o 5% (Phos-tag SDS-PAGE) (v/v), pH 8,1-8,4. La transferencia se efectuó aplicando un amperaje constante de 400 mA durante 4 horas (fracciones solubles, L+M y homogenado postnuclear del páncreas y plasmas humanos) o de 150 mA durante 15 horas (fracción enriquecida en membranas totales o geles Phos-tag) a 4°C.

2.12.4. Incubación de la membrana con los anticuerpos

Una vez realizada la transferencia se bloqueó la membrana en una solución de bloqueo que contenía leche desnatada al 5% (p/v) en TBS (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl

100 mM y Tween 20 al 0,05% (v/v)), durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario convenientemente diluido durante toda la noche a 4°C y con rotación constante. Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBS (tres veces, durante 10 minutos cada vez) y se incubó con una dilución adecuada del correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano durante 1 hora a temperatura ambiente y con rotación constante. Los diferentes anticuerpos utilizados en este trabajo de investigación se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para la análisis de proteínas mediante transferencias de Western.

Antígeno	Especie de procedencia	Tipo	Dilución	Casa comercial	Referencia
A1I3	Conejo	Policlonal	1:1000	abcam	ab61338
AAT	Cabra	Policlonal	1:2000	Santa Cruz	sc-14586
ARHGAP1	Ratón	Monoclonal	1:750	Santa Cruz	sc-398889
ATP sintasa 5b	Pollo	Policlonal	1:3000	Sigma	GW22827
Catepsina B	Conejo	Policlonal	1:200	Santa Cruz	sc-13985
Clusterina	Conejo	Policlonal	1:600	Santa Cruz	sc-8354
Complemento C4 beta	Conejo	Policlonal	1:600	Santa Cruz	sc-25816
COPB	Ratón	Monoclonal	1:1000	Santa Cruz	sc-393615
COPD	Cabra	Policlonal	1:200	Santa Cruz	sc-28153
COPG	Ratón	Monoclonal	1:1000	Santa Cruz	sc-393977
ERK total	Conejo	Policlonal	1:5000	Santa Cruz	sc-94
Fosfo-ERK	Ratón	Monoclonal	1:2000	Santa Cruz	sc-7383

Fetuina A	Conejo	Policlonal	1:2000 (páncreas) 1:30000 (plasma humano)	Santa Cruz	sc-28924
GAPDH	Ratón	Monoclonal	1:40000	Ambion	AM4300
GPR94/TRA1	Cabra	Policlonal	1:25000	Sigma	SAB2500482
Haptoglobina	Pollo	Policlonal	1:1500	Sigma	GW20080F
Hemopexina	Conejo	Policlonal	1:7500	Santa Cruz	sc-134443
Inhibidor C1 (C1INH)	Ratón	Monoclonal	1:2000	Santa Cruz	sc-377062
JNK total	Conejo	Policlonal	1:2000	Santa Cruz	sc-571
Fosfo-JNK	Cabra	Policlonal	1:1000	Cell Signaling	9251
LAMP2	Conejo	Policlonal	1:1000	Sigma	L0668
LIMP2	Cabra	Policlonal	1:5000	Santa Cruz	sc-25869
MCTS1	Conejo	Policlonal	1:150	ORIGENE	TA343797
p38 total	Ratón	Monoclonal	1:1000	Santa Cruz	sc-7972
Fosfo-p38	Ratón	Monoclonal	1:1000	Cell Signaling	9211
Peroxirredoxina 2	Conejo	Policlonal	1:10000	Sigma	R8656
PTP1B	Conejo	Policlonal	1:1000	abcam	ab52650
Quimiotripsinógeno B1 (CTRB1)	Cabra	Policlonal	1:1000	Santa Cruz	sc-161498
Quininógeno T 1/2	Cabra	Policlonal	1:1000	Santa Cruz	sc- 103886
Serpina A3K	Cabra	Policlonal	1:500	Santa Cruz	sc-162174
Serpina B1/B1a	Cabra	Policlonal	1:250	Santa Cruz	Sc-34304

Serpina B6	Cabra	Policlonal	1:500	Santa Cruz	sc-21145
SHP1	Ratón	Monoclonal	1:150	Santa Cruz	sc-7289
SHP2	Ratón	Monoclonal	1:2500	BD Biosciences	610622
StARD10	Conejo	Policlonal	1:500	ORIGENE	TA338127
STRAP 2	Ratón	Monoclonal	1:1500	BD Biosciences	611346
TPD54	Conejo	Policlonal	1:750	Santa Cruz	sc-85522
Tiorredoxina tipo 1 (TXNL1)	Pollo	Policlonal	1:5000	Sigma	GW22165A
VPS29	Conejo	Policlonal	1:1000	Santa Cruz	sc-98611

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados para la análisis de proteínas mediante transferencias de Western (conjugados con la peroxidasa de rábano).

Inmunorreactividad	Especie de procedencia	Dilución	Casa comercial	Referencia
En fracciones subcelulares del páncreas de rata				
Ratón	Oveja	1:10000	GE Healthcare	RPN4201
Ratón	Recombinante	1:5000	Santa Cruz	sc-516102
Conejo	Cabra	1:25000	Novex	A16096
Cabra	Burro	1:5000	Santa Cruz	sc-2020
Pollo	Conejo	1:30000	SIGMA	AP162P
En plasmas humanos				

Conejo (cadena ligera <i>kappa</i> de la IgG)	Ratón	1:25000	Jackson ImmunoResearch	115035174
--	-------	---------	---------------------------	-----------

2.12.5. Detección

Tras la incubación de la membrana con los anticuerpos, ésta se lavó de nuevo con TBS (tres veces, durante 10 minutos cada vez) y se sometió al revelado por el sistema de sustrato luminiscente para la peroxidasa de rábano mediante el kit comercial ECL plus Western Blotting Detection System de GE Healthcare, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Cuando la señal del anticuerpo primario era muy fuerte se empleó un sistema de revelado basado en el empleo de la solución de revelado AB [Solución A (Luminol 1mM, ácido cumárico 0,4 mM y Tris-HCl 100 mM pH 8,5) y solución B (H₂O₂ 0,02% y Tris-HCl 100 mM pH 8,5)]. Las membranas se incubaron durante dos minutos con esta solución de revelado AB. El tiempo de exposición de las películas a las membranas varió en función de la muestra. Tras la exposición, la película se reveló en una máquina de revelado para Western Medical X-ray Processor de Kodak.

2.13. Desfosforilación de proteínas con fosfatasa alcalina (ALP)

Cien µg de proteínas procedentes de plasmas de pacientes, de la fracción soluble y de la fracción de membranas totales del páncreas de rata se incubaron a 100 °C durante 5 minutos en un tampón Tris 5mM (pH 9,8), NaCl 10 mM, MgCl₂ 1mM, DTT 0,1 mM. Las alícuotas de la fracción soluble y de membranas totales del páncreas de rata fueron previamente dializadas frente a un tampón de homogeneización en ausencia de inhibidores de fosfatasas y desecadas. Las muestras desnaturalizadas se incubaron en presencia de 0.5 unidades (U) de fosfatasa alcalina de alta actividad (≥6500 U/mg de proteína) de mucosa intestinal bovina (SIGMA, P0114) a 37°C durante toda la noche. Para parar la reacción de desfosforilación, se adicionó tampón de carga a razón 1:1 y las muestras se incubaron a 100°C durante 5 minutos.

La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para la liberación de 1 µmol de 4-nitrofenil fosfato por minuto a pH 9,8 y 37°C.

2.14. Valoración de dianas proteicas en pacientes sometidos a CPRE

2.14.1. Población a estudio

Pacientes sometidos a CPRE en la unidad de Endoscopias del Hospital Universitario de Salamanca, donde se determinaron de forma aleatoria los pacientes a incluir previamente a la CPRE y se registraron en base de datos los parámetros epidemiológicos, clínicos, analíticos y pruebas de imagen de pacientes

- Criterios de inclusión: pacientes con indicación de CPRE y derivados a la unidad, que hayan firmado el consentimiento informado.
- Criterios de exclusión: pacientes con contraindicación/imposibilidad de realizar CPRE o con diagnóstico previo de PA.

2.14.2. Recogida de las muestras

Se realizaron extracciones de sangre previas a la técnica, tras finalizar la técnica (3-6 horas posteriores) y 24 horas después de la prueba, para determinación bioquímica habitual y valoración de dianas proteicas en plasma.

2.14.3. Obtención y tratamiento de los plasmas

Las muestras de sangre extraídas se centrifugaron para la obtención de los plasmas, que se trataron con el kit de enriquecimiento de proteínas ProteoMiner™ (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La tecnología ProteoMiner™ es una herramienta de preparación de muestras – principalmente, suero y plasma- utilizada para reducir el rango dinámico de concentración de proteínas, mientras se mantienen representantes de todas las proteínas de la muestra original, lo que favorece la detección de proteínas de abundancia media y baja. Las columnas ProteoMiner™ consisten en bibliotecas de ligandos de alta afinidad, formados por millones de hexapéptidos combinados. Cuando las muestras biológicas complejas se aplican a las columnas, las proteínas mayoritarias saturan sus ligandos específicos y el exceso de proteína se elimina por lavado, mientras que las proteínas de abundancia media y baja se concentran en sus ligandos.

Posteriormente, todas las proteínas fijadas se eluyen de la columna para su análisis posterior (Guerrier *et al.*, 2008).

Finalmente, se determinó la concentración de proteínas de los plasmas enriquecidos en proteínas no mayoritarias, que se prepararon para ser utilizados en transferencias de Western.

2.15. Análisis bioinformático

Para el análisis de enriquecimiento de rutas y categorías, los listados de proteínas diferencialmente expresadas se analizaron mediante la herramienta online PANTHER v11.1 (www.pantherdb.org) (Mi *et al.*, 2017), implementada en el servicio web de GO (Gene Ontology) (geneontology.org/page/go-enrichment-analysis) y se catalogaron por sus anotaciones en GO en las categorías de proceso biológico, componente celular y función molecular, así como por clase proteica en PANTHER. Se consideró que existía enriquecimiento estadístico cuando el p valor de la categoría correspondiente, calculado mediante el test de la binomial corregido por Bonferroni, fue inferior a 0.05.

Para el estudio de las rutas de señalización se empleó la base de datos KEGG PATHWAY (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), a través de la herramienta web de DAVID v.6.8 (<http://david.ncifcrf.gov/>) (Huang *et al.*, 2009a, 2009b).

La tasas de enriquecimiento de cada categoría (fold enrichment, FE) representa el cociente entre la frecuencia de dicha categoría en el listado de estudio en comparación con el correspondiente en el proteoma de referencia (*Rattus norvegicus*).

2.16. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos utilizamos IBM SPSS Statistics para MS Windows (versión 23.0). Los datos se expresan como la medias \pm D.E. (desviación estándar de la media) de, como mínimo, tres experimentos independientes ($n \geq 3$). Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico de la *U* de Mann-Whitney cuando el número de grupos a comparar fue igual a 2, o se realizó un análisis de Kruskal-Wallis

cuando el número de categorías a comparar fue mayor de 2. Se consideró un intervalo de confianza del 95% y significación estadística cuando $p < 0,05$. Los métodos estadísticos particulares de los diferentes análisis proteómicos se detallan en las secciones correspondientes.



IV. Resultados

Preámbulo:

A continuación presentamos los resultados en relación a los objetivos planteados, en la forma de las publicaciones a que han dado lugar y añadiendo otros resultados no publicados aún.

Aunque cada capítulo contiene su propia discusión, hemos incluido una discusión final conjunta con el propósito de dar una idea global del significado de nuestro estudio.

1.

Objetivo 1:

Analizar por técnicas proteómicas 2-DE las proteínas pancreáticas solubles y de la fracción subcelular que incluye a los lisosomas, cuyos niveles de expresión se modifiquen en la fase temprana de la PA mediada por Cer.



Proteomic analysis of the soluble and the lysosomal + mitochondrial fractions from rat pancreas: Implications for cerulein-induced acute pancreatitis

Violeta García-Hernández^a, Carmen Sánchez-Bernal^a, Nancy Sarmiento^a, Raúl A. Viana^a, Laura Ferreira^a, Nieves Pérez^a, José J. Calvo^b, Jesús Sánchez-Yagüe^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, Salamanca, Spain

^b Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2011

Received in revised form 8 May 2012

Accepted 6 June 2012

Available online 17 June 2012

Keywords:

Acute pancreatitis

Cerulein

Two-dimensional gel electrophoresis

Proteomics

Lysosome

ABSTRACT

Alterations in protein expression within the initiation phase of acute pancreatitis (AP) might play an important role in the development of this disease, lysosomes being involved in its pathophysiology. The use of pancreatic subcellular fractions in proteomic analysis, simplifies protein maps and helps in the identification of new protein changes and biomarkers characterizing tissue damage. The present study aims to determine the differentially expressed acidic proteins in the pancreatic soluble and lysosomal + mitochondrial (L + M) fractions from rats during the early phase of the experimental model of cerulein (Cer)-induced AP. Subcellular pancreatic extracts from diseased and control rats were analyzed by 2-DE (3–5.6 pH range) and MALDI-TOF/TOF MS. Comparative analysis afforded the conclusive identification of 13 (soluble fraction) and 7 (L + M fraction) proteins or protein fragments occurring in different amounts between diseased and control pancreas, some of them being newly described in AP. In the soluble fraction, we detected changes related to inflammation and apoptosis (α 1-inhibitor-3, α -1 antitrypsin, α -1 macroglobulin, haptoglobin, STRAP), oxidative stress and stress response (peroxiredoxin-2, thioredoxin-like 1, GRP94/TRA1, heat shock cognate 71 kDa protein), digestive proteases (elastase 3B), serine protease inhibition (serpins B6 and A3L) and translation processes (EF 1-6). In the L + M fraction, we detected changes mainly related to energy generation or cellular metabolism (ATP synthase β subunit, chymotrypsinogen B, triacylglycerol lipase), cell redox homeostasis (iodothyronine 5' monodeiodinase) and digestive proteases (carboxypeptidase B1). The data should provide valuable information for unraveling the early pathophysiological mechanisms of Cer-induced AP.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory condition of the pancreas characterized by a considerable variability in severity. Approximately 80% of patients develop a mild form of the disease that evolves favourably without serious morbidity [1]. The main intra and extracellular pathobiological pathways involved in AP are inflammation, edema, microcirculation dysfunction, cellular and oxidative stress responses, apoptosis and necrosis [2]. In mild AP, the disease is characterized by activation of digestive enzymes, with inflammation developed

only at the pancreatic level. This phase does not evolve towards the systemic inflammation and remote organ injuries seen in severe forms of pancreatitis [1]. The use of animal models of AP is important for the understanding of its pathobiology [3]. One of the experimental models of mild human edematous pancreatitis is that induced in the rat by cerulein (Cer), an analogue of cholecystokinin (CCK). Subcutaneous (s.c.) injection of repeated Cer doses under the conditions used for the induction of AP in the present studies resulted in manifestations of pancreatitis, including different indicators of morphological and histological damage to the pancreas, interstitial edema and hyperamylasemia, as well as neutrophil infiltration [4–8]. The important pancreatic molecular events in AP are: (1) digestive protease activation, mainly of trypsinogen [9], (2) the probable co-localization of digestive enzyme zymogens and lysosomal hydrolases [10], (3) alterations of the cytoskeletal organization, probably due to calpain activation [11], (4) inflammatory cell infiltration of the pancreas after elastase dissociation of cell-cell contacts at adherens junctions [12]. It is reasonable to assume that the development of pancreatitis would be based on rapid early events and the activation of primary signaling pathways, whose unmasking would be important for the study of AP at molecular level

Abbreviations: AAT, α 1-antitrypsin; ACN, acetonitrile; AP, acute pancreatitis; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; ATP5B, ATP synthase beta chain; CBP, carboxypeptidase; Cer, cerulein; CTRB1, chymotrypsinogen B; L + M, lysosomal + mitochondrial fraction; STRAP, Ser/Thr receptor-associated protein; TGF- β , transforming growth factor β ; TXNL-1, thioredoxin-like protein 1

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Edificio Departamental. Lab. 102. Plaza Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923294526; fax: +34 923294579.

E-mail address: sanyaj@usal.es (J. Sánchez-Yagüe).

[13]. However, regarding Cer-induced AP models, the interconexión of the interactions among the different pathobiological pathways hampers our understanding of the course of the disease and, especially, how those early events are initiated.

Proteomic analysis of tissue extracts from animal models of AP could provide new insights into the pathobiological processes of AP by allowing the identification of the specific proteins that change during its development. Furthermore, such analyses might unmask new potential diagnostic or prognostic biomarkers of AP. In a few reports, proteomic techniques have been used for the analysis of the protein changes occurring in AP, including 2-DE and MS/MS [14–16] and peptidomic approaches, thus allowing the identification of endogenous peptides produced in the pancreas [17], or proteomic techniques that use a combination of liquid chromatography–tandem mass spectrometry (2D LC-MALDI-M/MS) and isobaric tagging (iTRAQ) [18]. Recently, the iTRAQ proteomic approach has also been used for the analysis of rough endoplasmic reticulum from normal and AP pancreas [19]. ICAT (Isotope Coded Affinity Tags) technology, and MS/MS-based proteomics has also been used to study total tissue proteins from normal pancreas and chronic pancreatitis or pancreatic adenocarcinoma samples [20]. Studies using 2-DE techniques have focused on the identification of protein changes in model cell systems under culture (rat pancreatic acinar AR42J cells) [14,15] and in a rodent model of pancreatitis once the disease had fully developed [17], and the authors analyzed complex mixtures of proteins corresponding to the soluble portion of a whole homogenate from the cell cultures (pH range of 5–8) or the pancreas (pH range of 4–7). Nevertheless, the analysis of the protein changes occurring specifically during the early phases of Cer-induced AP, in particular subcellular fractions of the pancreas, and focusing on the acidic proteins, has not been performed previously. Accordingly, in the current study we performed a comparative 2-DE analysis (pH range 3–5.6) of the pancreatic soluble and lysosomal + mitochondrial (L + M) fractions from rats during the early phase of the experimental model of the edematous Cer-induced AP and from healthy controls. The putative relationship between the changes detected and key pathobiological pathways of AP is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (weighing 250–280 g) were housed in rooms maintained at 22 ± 1 °C using a 12-h light/dark cycle. Animals were fasted for 24 h before the experiment but had free access to water. Care was provided in accordance with the procedures outlined in European Community guidelines on ethical animal research (86/609/EEC), and the protocols were approved by the Animal Care Committee of the University of Salamanca.

2.2. Induction of AP and preparation of samples

The early phase of AP was induced as described previously [21]. Briefly, rats (4 animals per group) received 2 s.c. injections of 20 µg Cer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)/kg body weight or its vehicle (0.9% NaCl) at hourly intervals. At 2 h after the first injection, the animals were killed by cervical dislocation. The pancreata were rapidly harvested and used immediately for experiments. A small portion of them was used for haematoxylin and eosin staining [8]. The remaining parts of the pancreata were homogenized with a Potter Elvehjem device in 10 volumes (w/v) of homogenization buffer (3 mM imidazole buffer, pH 7.4 containing 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 µg/ml trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 µM TPCK and TLCK (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 2 µg/ml Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Every pancreas was homogenized individually, and the subcellular fractionation was done in a postnuclear homogenate of every pancreas as described

before [22]. This fractionation procedure allowed us to obtain four subcellular fractions: the zymogen, the L + M, the microsomal and the soluble (S) fractions. Here, the L + M and S fractions were used for further studies. The experiment was repeated one more time, so that the final number of control and pancreatitis rats included in the study was 8 each ($n = 8$). Serum amylase was measured with a Gernon Star Modular Analyzer, as reported previously [8]. Protein concentrations were assayed by the method of Bradford [23] using BSA as standard. Special care was taken with this assay in order to minimize deviations in the amount of proteins loaded in each lane of the SDS-PAGE gels. Quality control of the assays was ensured by repeating them at least three times with five different volumes of three-to-five different sample dilutions.

2.3. IEF and 2-DE separation

Samples for 2-D were prepared using the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's instructions. Samples from the L + M fractions used in the proteomic studies corresponded to the supernatants from a centrifugation (15,700 g, 5 min, 20 °C) step of particulate L + M fractions previously solubilized in the homogenization buffer used for the pancreas homogenization [22] containing 4% SDS (v/v) and 120 mM DTT (100 °C, 8 min). The sample (containing 100 and 700–900 µg protein for analytical and preparative gels, or 200 µg protein for Western blotting) was loaded onto an IPG strip holder with dry IPG strips (18 cm long, pH 3–5.6, non-linear; GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK), and actively rehydrated in 340 µl of rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 0.5% IPG buffer for 12 h (30 V for 6 h, 60 V for 6 h) at 20 °C. Isoelectric focusing was carried out with an Ettan IPGphor system (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) as follows: (i) 500 V; 500 Vh, (ii) 1000 V; 1000 Vh, (iii) a gradient to 8000 V; 2100 Vh, (iv) 8000 V; 50,000 Vh, (v) 500 V; 1000 Vh. Focused strips were then equilibrated using an equilibration solution (6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8 and 2% w/v DTT) for 15 min, followed by the same equilibration solution (2.5% iodoacetamide instead of DTT) for 15 min. The separation of proteins in the second dimension was performed with in-house manufactured 1.0-mm 10% SDS-PAGE gels at a current of 20 mA for 30 min, followed by a constant current of 50 mA. Analytical gels were stained with the Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) and preparative gels with Sypro Ruby (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Each sample was repeated three times.

2.4. Gel imaging and data analysis

Silver-stained gels were digitalized using an Image Scanner (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) at a resolution of 600 dpi (dots per inch), and image analysis was performed with the Image Master, 2D Platinum 6.0. Software (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK). The differentially expressed proteins whose expression level was more than a three-fold increase in the Cer-treated rats as compared to the untreated rats and passed Student's *t*-test ($p < 0.05$) were selected for the MALDI-TOF/TOF MS analyses. For each analysis set, the spots detected were normalized by dividing each spot volume by the total volume of all the matched spots, and then multiplied by 100 to obtain the spot percentage (normalized spot volume, vol %). The apparent M_r of each protein in gel was determined with protein markers.

2.5. Protein identification and classification

Spots of interest from the Sypro Ruby-stained 2D gels were excised manually and sent to the Proteomic Laboratory of the National Center of Biotechnology (CNB-CSIC, Madrid, Spain) for protein identification and

classification. Samples were deposited in 96-well plates and processed automatically in a Proteiner DP (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The in-gel digestion method of Schevchenko et al. [24] was followed, with minor changes: after washing the gel plugs with 50 mM NH_4HCO_3 and then with acetonitrile (ACN), they were reduced with 10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 , and alkylated with 55 mM iodoacetamide in 50 mM NH_4HCO_3 . Then, the gel pieces were washed as indicated above, dried under a stream of nitrogen, and finally rehydrated in 25% ACN/50 mM NH_4HCO_3 with 16 ng/ μl modified porcine trypsin (sequencing grade; Promega, Madison WI) at 37 °C for 6 h. The reaction was stopped by adding 0.5% trifluoroacetic acid for peptide extraction. The tryptic peptides eluted were dried by speed-vacuum centrifugation and resuspended in 4 μl of MALDI solution. 0.8 μl of each peptide mixture was spotted onto a 386-well OptiTOF™ Plate (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), allowed to dry at room temperature, followed by 0.8 μl of matrix solution (3 mg/mL CHCA in MALDI solution), which was also allowed to dry at room temperature. For MALDI-TOF/TOF analyses, samples were acquired automatically in an ABI 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) in positive-ion reflector mode (the ion acceleration voltage was 25 kV to MS acquisition and 1 kV to MSMS) and the spectra obtained were stored in a ABI 4000 Series Explorer Spot Set Manager. PMF and MSMS fragment ion spectra were smoothed and corrected to the zero baseline using routines embedded in the ABI 4000 Series Explorer Software v3.6. Each PMF spectrum was calibrated internally with the mass signals of trypsin autolysis ions to reach a typical mass measurement accuracy of <25 ppm. Known trypsin and keratin mass signals, as well as potential sodium and potassium adducts (+21 Da and +39 Da) were removed from the peak list. To submit the combined PMF and MS/MS data to MASCOT software v.2.1 (Matrix Science, London, UK), the GPS Explorer v4.9 was used, searching in the non-redundant NCBI protein database (NCBINr 20100903 (11744690 sequences; 4010973687 residues). The following search parameters were used: enzyme, trypsin; allowed missed cleavages, 1; carbamidomethyl cysteine as a fixed modification by treatment with iodoacetamide; variable modifications, oxidation of methionine; mass tolerance for precursors was set to ± 50 ppm and for MS/MS fragment ions to ± 0.3 Da. The confidence interval for protein identification was set to $\geq 95\%$ (protein score greater than 80, $p < 0.05$) and only peptides with an individual ion score above the identity threshold (30 for these events) were considered to have been correctly identified.

2.6. SDS-PAGE and Western blot analyses

Proteins were analysed by SDS-PAGE using 10, 15 or 20% gels [25] and then transferred to PVDF membranes. Western blots were probed [21] with monoclonal antibodies for Ser/Thr receptor-associated protein (STRAP) (1:1500; BD Transduction Laboratories, Madrid, Spain) or GAPDH (1:40,000; Ambion, Applied Biosystem, Austin, TX, USA) and polyclonal antibodies for $\alpha 1$ -antitrypsin (AAT) (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA), $\alpha 1$ -inhibitor-3 (A1I3) (1:1000, Abcam, Cambridge, UK), ATP synthase beta chain (ATP5B) (1:3000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), chymotrypsinogen B (CTRB1) (V-13) (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA), GPR94/TRA1 (1:25,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), haptoglobin (1:1500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), peroxiredoxin 2 (C-t) (1:10,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), serpinB6 (M-12) (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA), and thioredoxin-like protein 1 (TXNL-1) (1:5000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Appropriate dilutions of secondary sheep anti-mouse (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK), rabbit-anti-chicken (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), goat anti-rabbit (ZYMED, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and donkey-goat (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA) antibodies were used, and the blots were visualized by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little

Chalfont, UK). Analyses of the spots on all the blots were performed as described previously [26]. For the soluble fractions, the densities of the GAPDH bands were used to ascertain that an approximately equal amount of proteins had been loaded in each lane. For the L + M fractions, in the absence of a known and commonly accepted unchanged protein loading control was ascertained by densitometric analysis of scanned images from the membranes after reversible Ponceau S staining [27]. The images shown in the figures are from blots whose films were exposed for optimal reproduction rather than for the linearity of band densities.

3. Results

3.1. Cer treatment leads to the rapid onset of AP

The establishment of the initial phases of clinically relevant relatively mild edematous pancreatitis was monitored by serum amylase determination and histological assessment: 2 h after the first injection of Cer, serum amylase activity was increased significantly and histological evidence of pancreatic acinar cell disruption as well as the location of some lymphocytes outside of the vessels were observed (Supporting information 1). These features are similar to previously reported data concerning the onset of Cer-induced AP [8].

3.2. Proteomic analysis of pancreatic tissues during the early phase of Cer-induced AP

2-DE separations were repeatedly performed between pH 3–5.6 on the protein extracts from pancreata of untreated and Cer-treated rats. Since we were interested in early pancreatic events, the studies were carried out in order to find proteins that change in the first 2 h of Cer-induced AP. Moreover, to decrease protein sample complexity, subcellular fractionation of the pancreas was carried out, and both the soluble and the L + M fractions were analyzed. The characterization of the subcellular fractions has been described previously [22] (see also Supporting Information 2 for the efficiency of the subcellular fractionation). Computer analysis of the gel images showed a good match among the analytical replicates and between the samples from control or AP rats. The correlation coefficients calculated ranged between 0.85 and 0.90 (see Supporting Information 3 for an example of the reproducibility of the 2D procedure). In this study, approximately 800 and 400 proteins were reproducibly resolved on each gel for the soluble and the L + M fractions, respectively. In all, we found that 42 (soluble fraction) and 13 (L + M fraction) spots changed significantly during the early phase of Cer-induced AP [41 and 1 spot in the soluble fraction (Fig. 1), and 1 and 12 spots in the L + M fraction (Fig. 2), with an expression level more than three times higher or lower in the Cer-treated rats, respectively]. Within these 42 spots, those positively identified by MALDI-TOF-TOF MS are shown in Tables 1 and 2. In some cases, the experimental mass and/or isoelectric point values of the spots differed from their theoretical values, probably due to post-translational modifications such as glycosylation, phosphorylation and cleavage, which can alter protein molecular weight and charge [28]. It should be noted that when using “protein expression” we refer to the amount of a given protein. Accordingly, a change in protein expression does not imply any particular molecular mechanism at gene level or at protein level (both proteolysis and redistribution have been described to occur in pancreatitis). The proteins found to be increased were associated with inflammatory and stress responses, which are major pathobiological pathways in AP. Enlargements of 2-DE maps showing examples of changes in the amount of particular proteins between AP and control pancreatic tissue are shown in Fig. 3. In the soluble fraction, A1I3 was present as different isoforms. In fact, 12 of the increased spots detected during the early phase of AP corresponded to two groups of isoforms that included N-t or C-t fragments of the protein (Supporting information 4). The digestive protease, elastase 3B, appeared in the AP samples, although we were

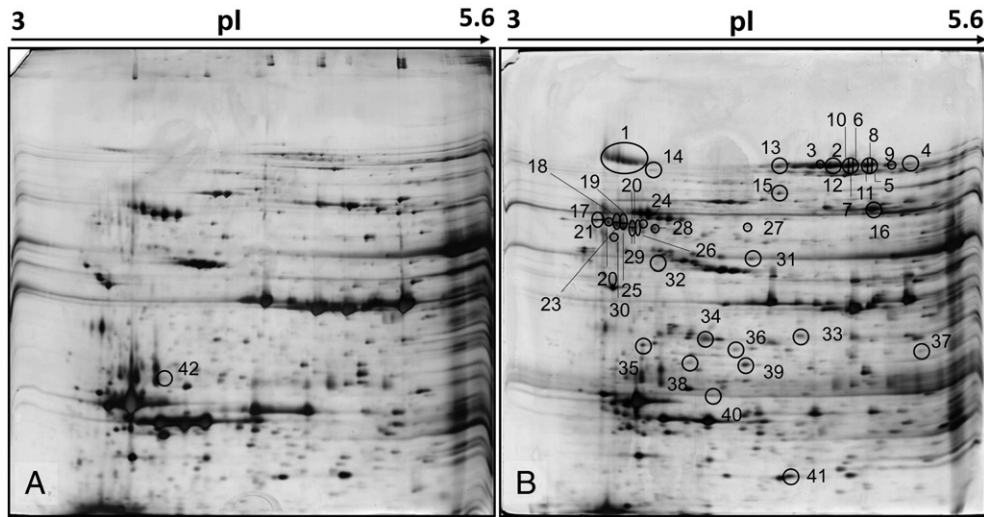


Fig. 1. 2-DE maps of pancreatic soluble fractions derived from control (A) and pancreatic (B, early phase, 2 h after the first injection of Cer) rats. One hundred μg of protein was loaded on pH 3–5.6 IPG strips (18 cm). The second dimension was performed on a 10% T SDS-PAGE gel. The gel was visualized by silver staining. The 42 spots numbered are those that were differentially expressed [the expression level was more than a three-fold difference higher (1 to 41) or lower (42)] between control and Cer-treated rats.

unable to determine whether this spot corresponded to the zymogen form of the enzyme, mainly because differences in the apparent M_r between zymogen and the active form of elastase 3B are too small, and also because it was not possible to estimate the experimental pI due to the lack of linearity in the pH of the IPG strips used for the analyses. Other increased proteins such as GPR94, α -1-macroglobulin and AAT, involved in cellular stress or inflammatory responses in AP, were also identified. Moreover, we detected some increased proteins that, to our knowledge, have never been described in AP: STRAP, serpin B6 and TXNL-1. A role can be proposed for these proteins in the pathobiological process of AP, as well as for peroxiredoxin 2, a protein whose expression has also been reported to be increased in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells [15].

Regarding the L+M fraction, comparative 2-D analysis revealed two spots that increased in expression (Fig. 2). We were able to obtain an identification for only one of them but the protein identified differed depending on whether it was detected on preparative gels

stained with Sypro Ruby (CTRB1), or silver-stained gels (a fragment of the ATP5B). This probably reflects a very close location of both proteins on the gel, but a different labelling behaviour towards both staining reagents, such that we were picking up the protein that was most visible each time. Additionally, we detected a decreased amount or the disappearance of certain other proteins such as pancreatic triacylglycerol lipase and the active form of CBPB1 (Supporting Information 5). The presence of the latter active digestive enzyme in the control samples might be due to a low rate of activation of this enzyme during tissue sampling, as has already been reported in the proteomic profiling of a rat model of Cer-induced AP [16]. Iodothyronine 5'-monodeiodinase (the entire protein and two N-t fragments) as well as actin γ 1 propeptide-like (actin, cytoplasmic 2, N-t fragment) disappeared or decreased strongly in the AP samples (Supporting Information 5).

Two possible explanations for all changes not described so far are: (1) the changes would be confined to the early phase of Cer-induced

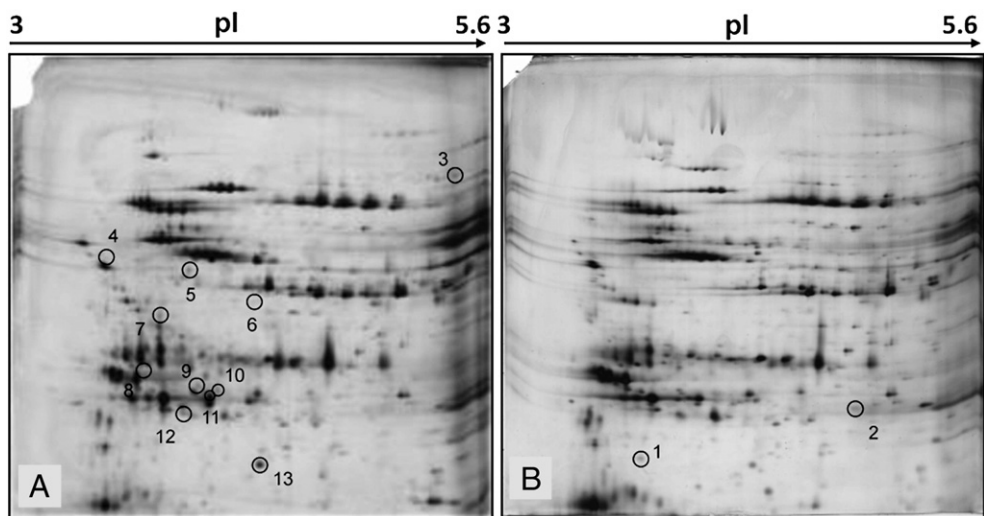


Fig. 2. 2-DE maps of pancreatic L+M fractions derived from control (A) and pancreatic (B, early phase, 2 h after the first injection of Cer) rats. One hundred μg of protein was loaded on pH 3–5.6 IPG strips (18 cm). The second dimension was performed on a 10% T SDS-PAGE gel. The gel was visualized by silver staining. The 13 spots numbered are those that were differentially expressed [the expression level was more than a three-fold difference higher (1 and 2) or lower (3 to 13)] between control and Cer-treated rats.

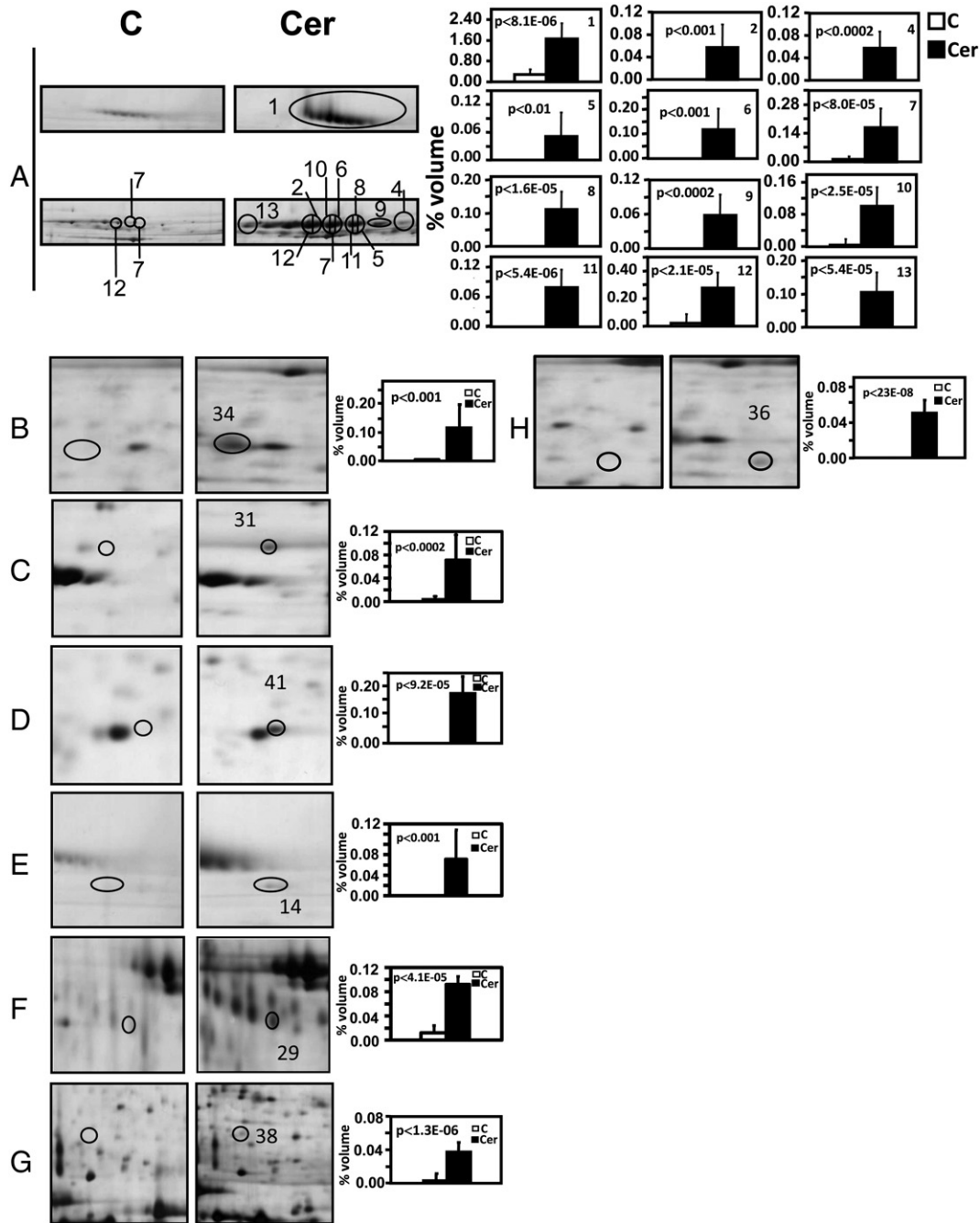


Fig. 3. Segments of the pancreatic 2-DE gel maps derived from control and pancreatic (early phase, 2 h after the first injection of Cer) rats. Eight identified proteins whose expression level increased more than 3-fold in Cer-induced AP rats are numbered: A, A113 (12 spots); B, STRAP; C, AAT; D, peroxiredoxin 2; E, GPR94/TRA1; F, serpin B6; G, TXNL-1; H, haptoglobin. The expression level is shown as a normalized spot volume (graphs) and was determined as indicated in the Materials and methods section.

AP, (2) they would become visible owing to the simplification of the start sample and/or the restricted pH range used in this study. Additional work will be needed to resolve this issue.

3.3. Immunoblots

Immunoblot experiments on pancreatic soluble and L+M subcellular fractions were performed to verify the MS data obtained for some of these proteins (Figs. 4 and 5). In the soluble fraction, A113, an acute-phase inflammatory protein, increased strongly during the early phase of Cer-induced AP, and it was detected as fragments, probably resulting from its anti-protease activity [29]. Western blotting of the 2-DE gels corroborated that the spots previously identified

by MS as fragments of A113, including the N-t end, indeed corresponded to this protein (Supporting Information 6). Nevertheless, the fragments of A113 that included the C-t end were not detected in the blots, which probably indicates that the anti-A113 antibody used only recognizes the N-t end of the protein. This means that the relative amounts of A113 fragments at around 100 kDa in the blots from the 1-DE gels (Fig. 4) are underestimated. In any case, immunoblot validation confirmed both that A113 was cleaved and also that full-length A113 increased strongly in the AP samples as compared to the controls. The failure to detect increased expression of the full-length A113 in the 2-DE gels could be explained in terms of its high Mr (2-DE analysis has a poor recovery of high-Mr proteins) and to the fact that its pI is outside the pH separation range of the

Table 1
Identified proteins from the soluble fraction and their relative changes during the early phase of Cer-induced AP.

Spot ID ^a	Acc. no. ^b	UniProtKB	Name	Theoretical (M_r /kDa) pI ^c		Experimental (M_r /kDa)	AP/Ctl ratio ^d	Scores	MP/TP ^e	Sequence coverage (%) ^f	Pathobiology/Function
1	gi 83816939	P14046	α -1-inhibitor 3 (C-t fragments)	165	5.70	100	5.8	659	26/43	17	Inflammatory response
2 (4–13)	gi 83816939	P14046	α -1-inhibitor 3 (N-t fragments)	165	5.70	95	12.47-appear	665-753	26-33/84	18-20	Inflammatory response
38	gi 257096637	Q68FR9	Eukaryotic translation elongation factor 1- δ (EF-1- δ)	31	4.94	30	13.37	575	23/107	60	Translation
36	gi 60097941	P06866	Haptoglobin	37	5.96	35	Appear	380	27/107	42	Inflammatory response
34	gi 58865512	Q5XIG8	Ser/Thr kinase receptor associated protein (STRAP)	38.7	4.99	40	Appear	749	19/107	49	TGF- β signal transduction pathway
14	gi 210032365	Q66HD0	Tumor rejection antigen gp 96 (GRP94/TRA1)	93	4.72	95	Appear	290	23/48	29	Response to cellular stress
25	gi 133777069	P05545	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, class A, member 3 K (Serpins B6)	46	5.30	65	4.63	936	31/109	60	Serine protease inhibition
29	gi 2507387	P05544	Serine protease inhibitor A3L (Serpins A3L)	46	5.48	65	7.73	836	28/121	57	Inflammatory response
19						70	9.4	753	33/114	61	
28						65	11.02	300	18/72	44	
31	gi 203063	P17475	α -1-antitrypsin precursor (AAT)	44	5.6	60	Appear	623	24/64	48	Inflammatory response. Protease inhibitor
33	gi 81872093	Q63041	α -1-macroglobulin	168	6.46	40	7.78	234	17/37	8	Inflammatory response
36	gi 149024340		Elastase 3B, isoform CRA_a	25	5.81	35	Appear	63	3/18	14	Serine protease. Digestive enzyme
38	gi 18266686	Q920J4	Thioredoxin-like 1	32	4.84	35	13.37	346	15/38	53	Cell redox homeostasis
41	gi 8394432	P35704	Peroxisome oxidin 2	22	5.34	25	Appear	718	15(80)	41	Response to oxidative stress.
16	gi 13242237	P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	71	5.37	75	11.99	807	37/119	52	Unknown

^a Assigned spot number as indicated in Fig. 1.

^b Acc. No.: NCBI database accession number.

^c Theoretical M_r and isoelectric point values were retrieved from the NCBI database.

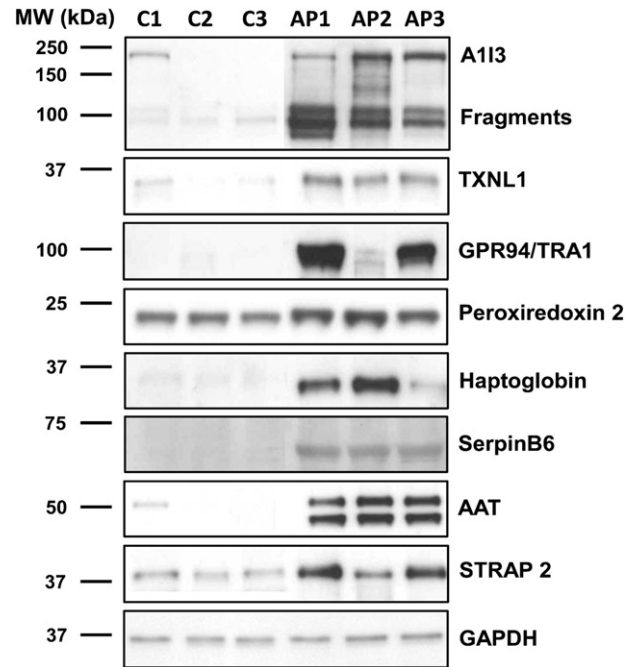
^d AP/Ctl ratio: acute pancreatitis/control ratio, calculated as indicated in Materials and methods.

^e Number of the matched peptides and the total searched peptides.

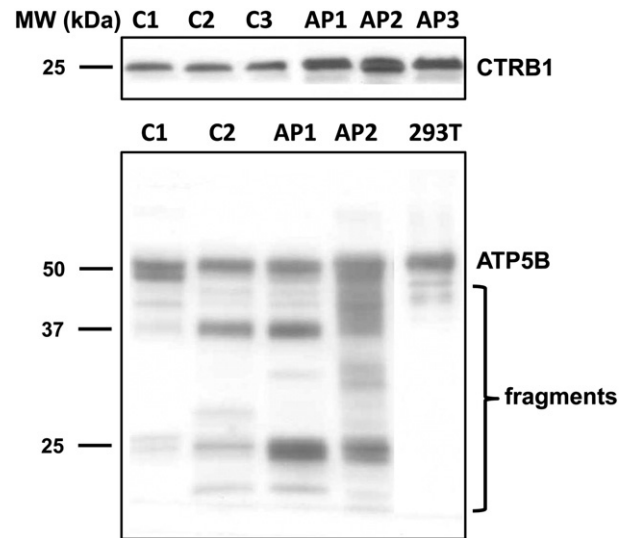
^f The amino acid sequence coverage for the identified proteins.

Table 2
Identified proteins from the L + M fraction and their relative changes during the early phase of Cer-induced AP.

Spot ID ^a	Accession ^b	UniProtKB	Name	Theoretical (M _r /kDa)	pI ^c	Experimental (M _r /kDa)	AP/CTL ratio ^d	Scores	MP/TP ^e	Sequence coverage (%) ^f	Pathobiology/Function
1	gi 89574017	Q0QEP3	Mitochondrial ATP synthase, H ⁺ transporting F1 complex β subunit	37	4.97	25	4.75 ^g	368	10/18	19	ATP synthesis coupled proton transport
1	gi 6978717	P07338	Chymotrypsinogen B precursor	28	4.90	25	4.75 ^h	414	8/29	17	Digestion. Protein catabolic process
4	gi 6981376	P27657	Pancreatic triacylglycerol lipase precursor	52	6.31	55	Disappear	702	26/67	50	Lipid degradation
7	gi 202549	P04785	Iodothyronine 5' monodeiodinase	54	4.87	45	Disappear	814	26/45	37	Cell redox homeostasis
11						30	Disappear	462	12/55	25	
13						25	-40.29	519	11/45	23	
9	gi 293342999	P63259	Actin, γ 1 propeptide-like	42	5.31	30	-21.73	290	9/39	25	Response to Ca ⁺⁺ ion. ATP binding
10	gi 157820097	D4A919	Endoplasmic reticulum resident protein 27	31	4.93	30	Disappear	244	8/57	19	
12	gi 149048541		Carboxypeptidase B1 (tissue), isoform CRA_b	44	5.50	30	-24.92	743	20/52	38	Protease activation. Digestive enzyme

^a Assigned spot number as indicated in Fig. 2.^b Acc. No.: NCBI nr database accession number.^c Theoretical M_r and isoelectric point values were retrieved from the NCBI nr database.^d AP/CTL ratio: acute pancreatitis/control ratio, calculated as indicated in Materials and methods.^e Number of the matched peptides and the total searched peptides.^f The amino acid sequence coverage for the identified proteins.^g Silver stained gels.^h Sypro Ruby stained gels.**Fig. 4.** Western blot analysis for A113, TXNL1, GPR94/TRA1, peroxiredoxin 2, haptoglobin, serpin B6, AAT, and STRAP. Proteins from the soluble fractions (10–15 μ g) were separated by 10% (TXNL-1, GPR94/TRA1, haptoglobin, serpin B6, AAT, STRAP), or 20% (peroxiredoxin 2) SDS-PAGE, and transferred onto PVDF membranes by electroblotting. Immunodetection was performed as described in the Materials and methods section. GAPDH was used as a loading control. 3 control (C) and 3 pancreatic (AP) animals are shown.

IPG strips. Immunoblot analysis also confirmed the increase in expression during the early-phase of Cer-induced AP of the other seven proteins assayed. With respect to the L + M subcellular fraction, immunoblot validation confirmed the increase in the amount of CTRB1 in the AP samples (Fig. 5). Also, we detected strong increases in the expression of a fragment of the ATP5B, with a very similar apparent M_r to that of CTRB1, which could explain the results of the

**Fig. 5.** Western blot analysis for CTRB1 and ATP5B. Protein extracts from the L + M fractions (20 μ g) were separated by 15% (ATP5B) or 20% (CTRB1) SDS-PAGE, and transferred onto PVDF membranes by electroblotting. Immunodetection was performed as described in the Materials and methods section. Equal loading of the proteins was assessed by Ponceau S staining of the membranes. 3 (CTRB1) or 2 (ATP5B) control (C) and 3 (CTRB1) or 2 (ATP5B) pancreatic (AP) animals are shown. 293 T cell lane in the lower panel was included as internal control for the assessment of the correct molecular weight of ATP5B.

2-DE analysis described above. The immunoblots also allowed us to confirm the existence of other different fragments of this protein, some of them also being present in the control samples (i.e. 37 kDa fragment). With respect to the full-length ATP5B, no differences in expression were observed in the immunoblots (Fig. 5). Nevertheless, the strong increase in the 25 kDa fragment in the AP samples might reflect an increase in the total amount of ATP5B during the early phase of Cer-induced AP.

4. Discussion

The two main pathological conditions related to the pancreas that have been studied using 2-DE proteomic techniques are pancreatic cancer and diabetes. AP pathobiology has received little attention using this technique, and some of the studies were set up with acinar cell lines [14,15,30] rather than with pancreatic tissue from animal models [16]. In this latter case, the study was performed in whole tissue extracts, obtained once AP was fully developed, that were analyzed with IPG strips in the 4–7 pH range. In the animal model of AP used in the present studies, a full development of the disease is reached 9 h after the first of 4 s.c. injections of Cer doses [4]. It has been proposed that alterations in gene expression within the initiation phase of AP play an important role in its development [13]. Taken this into account, we have previously divided the development of that animal model of AP into early, intermediate and later (2, 4 and 9 h after the first injection of Cer, respectively) phases of AP [8,21], and we have previously described that several protein tyrosine phosphatases are already overexpressed during the early phase [8,21]. Taken into account the potential importance of the early changes in protein expression in AP, that these protein changes might be different from those detected once AP is fully developed, and because, to the best of our knowledge, no proteomic studies have been done with subcellular fractions from pancreatic pancreas during the early phase of AP development, in the present study, we performed a 2-DE analysis of the acidic proteins that change in the soluble and the L + M pancreatic subcellular fractions during the early phase of Cer-induced AP in the rat. Although proteomic analysis of the zymogen fraction is important, owing to the well known redistribution of proteins from lysosomes to zymogen-containing granules in AP [31,32], we consider it more interesting to address such investigation in further studies in which highly pure zymogens and lysosomal subpopulations obtained with Percoll density gradient centrifugation will be included [22]. The present study led to the identification of several proteins involved in key pathobiological pathways of AP.

With respect to the soluble fraction, we mainly detected changes in proteins related to inflammation, apoptosis, oxidative stress and stress responses, as well as in different proteases and serine protease inhibitors.

4.1. Inflammation and apoptosis

Several acidic proteins involved in inflammatory responses appeared or increased their expression levels in the soluble fraction of rat pancreatic tissue as early as two hours after the first injection of Cer (early phase of Cer-induced AP): haptoglobin, α -1 macroglobulin and the two rat acute phase proteins A113 and AAT. It has previously been reported that both α -1 macroglobulin and A113 increase their concentrations in rat pancreatic tissue from fully developed Cer-induced AP [16]. Accordingly, the higher amount of A113 and the appearance of AAT are early phenomena during the onset of Cer-induced AP. A113 was detected as N-t and C-t fragments, as reported elsewhere [16]. The role of A113 is to inhibit endopeptidases such as trypsin [33] through the same mechanism as the α macroglobulins. The fact that both N-t and C-t fragments of A113 had roughly the same apparent Mr is in accordance with the interaction of A113 with activated digestive proteases in the so called “bait region”,

present near the middle of the macroglobulins. The α -1 macroglobulin was also increased as fragments. Accordingly, these data suggest that α -macroglobulins could play an important protective role as from the early phase of Cer-induced AP. The appearance of the plasma protein haptoglobin, an acute inflammatory-phase protein, might be due to the increased vascular permeability associated with AP. Similarly, the acute-phase protein AAT, which predominantly inhibits neutrophil elastase and which is expressed in macrophages, can be explained in terms of the formation of edema and macrophage infiltration associated with the early inflammatory response.

An interesting observation was the increase in the expression of STRAP, an important element of the transforming growth factor β (TGF- β) family of cytokine signal transduction. STRAP can associate with TGF- β 1, a cell growth factor mainly related to the apoptosis of damaged acinar cells to alleviate the inflammatory reactions of AP [34]. STRAP inhibits TGF- β signaling [35,36] and acts as a negative regulator of the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 signaling cascade [37], the activation of MAP kinases being one of the key pathogenic mechanisms in pancreatitis and other inflammatory diseases [38]. Intriguingly, the amounts of other negative regulators of ASK1, thioredoxin and 14-3-3 proteins (negative regulators of apoptosis), are also modulated in AP [this work, 16]. To the best of our knowledge, this is the first description of the possible involvement of STRAP in AP.

4.2. Oxidative stress and stress responses

We detect the appearance of peroxiredoxin-2 and the increase in TXNL-1 during the early phase of Cer-induced AP. Peroxiredoxins and thioredoxin-1 are anti-oxidant and anti-inflammatory proteins, and hence play a role in oxidative stress responses [39], and it is also known that oxidative stress is involved in the development of the inflammatory response in AP [38]. Previously, using comparative 2-DE analysis it has been reported that at least peroxiredoxin-3, and probably also peroxiredoxin-4 and -6, decrease their expression in fully developed Cer-induced AP, probably due to conversion of the active reduced forms to inactive overoxidized forms, which would later be degraded [16]. It is possible that during the early phase of Cer-induced AP, an increase in the amount of at least some types of peroxiredoxins, such as peroxiredoxin-2, would occur as an early response to oxidative stress. In fact, it has been reported that peroxiredoxin-1 and -2 are up-regulated by oxidative and nitrosative stress in pancreatic beta cells [40]. Additionally, it is known that thioredoxin-1 is inducible by several types of stress and that it plays an important role in host defense mechanisms [41]. Moreover, the protective effects of thioredoxin-1 in both severe AP and chronic pancreatitis have been reported previously [42,43]. The expression of some stress proteins has been shown to be both increased or decreased after the induction of AP [16,44,45]. In fact, the heat shock protein (HSP) GRP94/TRA1, also called endoplasmic reticulum chaperone, decreased in a rat model of fully developed Cer-induced AP [16]. The appearance of this protein in the soluble fraction during the early phase of Cer-induced AP is intriguing because GRP94/TRA1 is a soluble endoplasmic reticulum protein. Our observations could indicate a missorting of the protein or could be the result of an increased lability of the endoplasmic reticulum membrane. Accordingly, its appearance in the soluble fraction might be due to the fractionation process of the pancreatic pancreas. Nevertheless, it should be taken into account that no other resident endoplasmic reticulum protein was detected in the pancreatic samples. Another HSP, the cytoplasmic heat shock cognate 71 kDa protein, increased during the early phase of Cer-induced AP. This might be due to an attempt to protect against stress, although apart from its function as a chaperone it might function as a repressor of transcriptional activation. Furthermore, fragments of this latter HSP have been detected, specifically in pancreatic extracts from rats with fully developed Cer-induced AP [16], but some other HSPs, such as HSP70 and HSP27, remained increased after the induction of AP

[44,45]. Accordingly, the dynamics of different HSP seems to be complex and probably protein specific.

4.3. Other changes in proteins from the soluble fraction

The appearance of the serine protease elastase 3B, a protein secreted from the pancreas as zymogen with a digestive function in the intestine, might be due to an increase in the fragility of the membrane of the zymogen-lysosome system associated with AP [22]. Recently, the activation of digestive proteases in fully developed Cer-induced AP has been visualized using comparative 2-DE analysis [16].

We also detected increased amounts of two members of the serine protease inhibitor superfamily (serpins): serpin B6 and A3L, which might indicate a protective role of serpins as from the early phases of Cer-induced AP. SerpinB6 is primarily a cytoplasmic serine protease inhibitor with both antitrypsin and antichymotrypsin activity, which can also bind kallikrein 2 and cathepsin G proteases. Serpin A3L is a secreted glycoprotein, mainly produced by the liver, with an antiprotease activity similar to contrapsin. The presence of this latter protein in the pancreatic samples might be due to the increased vascular permeability associated with AP. Furthermore, in the AP samples we found an increase in the expression of EF1- δ , one of the stimulators of the replacement of GDP bound to EF- α by GTP. This observation seems to indicate changes in translation processes as from the early phase of Cer-induced AP, which eventually might influence the expression levels of different set of proteins.

With respect to the L + M fraction, we detected an increase in a 25-kDa fragment of the ATP5B, although the intact protein remained more or less unchanged. It has been reported previously that the ATP5B reduces its expression in an animal model of fully developed Cer-induced AP, perhaps due to an alteration of cellular metabolism following acinar cell injury [16]. By contrast, using pancreatic acinar cells in culture, the ATP5B has been shown to be increased [14,30]. Our results suggest that in an animal model of Cer-induced AP there is an increased proteolysis of the ATP5B as from the early phases. The increased expression of CTBR1 might be explained in terms of the redistribution of the lysosomal and digestive enzymes known to occur in AP [22,46]. Also, we detected a decreased expression of some other proteins and protein fragments, some of them with chaperone activity, but whose significance remains unclear and will need further investigation.

Taken together, using comparative 2DE-analysis we were able to detect significant changes in protein amounts related to many pathobiological pathways of AP as from the early phase of the disease. To our knowledge, some of these changes, which could also be related to the pathophysiological mechanisms of AP, have never been described in this disease.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.06.003>.

Acknowledgements

This work was supported by Spanish grants PI09/1075 [FEDER -FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias)], SA005A10-2 (Junta de Castilla y León) and Biomedicina, BIO 103/SA39/11 (Junta de Castilla y León). V. García-Hernández was a recipient of a Spanish predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. N. Sarmiento was a recipient of a predoctoral fellowship from Banco Santander. We also thank J. Hueso (Hospital Fundación Santísima Trinidad, Salamanca, Spain) for his help with the amylase determinations.

References

- J.L. Frossard, M.L. Steer, C.M. Pastor, Acute pancreatitis, *Lancet* 371 (2008) 143–152.
- S.J. Pandol, A.K. Saluja, C.W. Imrie, P.A. Banks, Acute pancreatitis: bench to the bedside, *Gastroenterology* 132 (2007) 1127–1151.
- Y.C. Chan, P.S. Leung, Acute pancreatitis animal models and recent advances in basic research, *Pancreas* 34 (2007) 1–14.
- R. Alonso, A. Montero, M. Arévalo, L.J. García, C. Sánchez-Vicente, F. Rodríguez-Nodal, J.M. López-Novoa, J.J. Calvo, Platelet-activating factor mediates pancreatic function derangement in caerulein-induced pancreatitis in rats, *Clin. Sci.* 87 (1994) 85–90.
- R. Pescador, M.A. Manso, A.J. Revollo, I. de Dios, Effect of chronic administration of hydrocortisone on the induction and evolution of acute pancreatitis induced by cerulein, *Pancreas* 11 (1995) 165–172.
- N. Yönetçi, N. Oruç, A.O. Özütmez, H.A. Celik, G. Yüce, Effects of mast-cell stabilization in caerulein-induced acute pancreatitis in rats, *Int. J. Pancreatol.* 29 (2001) 163–171.
- M. Zhao, D.B. Xue, B. Zheng, W.H. Zhang, S.H. Pan, B. Sun, Induction of apoptosis by artemisinin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis, *World J. Gastroenterol.* 14 (2007) 5612–5617.
- N. Sarmiento, C. Sánchez-Bernal, N. Pérez, J.L. Sardina, A. Mangas, J.J. Calvo, J. Sánchez-Yagüe, Rolipram and SP600125 suppress the early increase in PTP1B expression during cerulein-induced acute pancreatitis in rats, *Pancreas* 39 (2010) 639–645.
- K. Mithöfer, C. Fernández-del Castillo, D. Rattner, A.L. Warshaw, Subcellular kinetics of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis, *Am. J. Physiol.* 271 (1998) G71–G79.
- G.J. van Acker, G. Perides, M.L. Steer, Co-localization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 1985–1990.
- H. Weber, S. Hühns, F. Lüthen, L. Jonas, Calpain-mediated breakdown of cytoskeletal proteins contributes to cholecystokinin-induced damage of rat pancreatic acini, *Int. J. Exp. Pathol.* 90 (2009) 387–399.
- J. Mayerle, J. Schnekenburger, B. Krüger, J. Kellermann, M. Ruthenbürger, F.U. Weiss, A. Nalli, W. Domschke, M.M. Lerch, Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats, *Gastroenterology* 129 (2005) 1251–1267.
- B. Ji, X. Chen, D.E. Misek, R. Quick, S. Hanash, S. Ernst, R. Najarian, C.D. Logsdon, Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator, *Physiol. Genomics* 14 (2003) 59–72.
- J.H. Yu, S.Y. Yun, J.W. Lim, H. Kim, K.H. Kim, Proteome analysis of rat pancreatic acinar cells: implication for cerulein-induced acute pancreatitis, *Proteomics* 3 (2003) 2446–2453.
- J.H. Yu, J.Y. Seo, K.H. Kim, H. Kim, Differentially expressed proteins in cerulein-stimulated acinar cells: implication for acute pancreatitis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 503–516.
- V. Fétaud, J.L. Frossard, A. Farina, C.M. Pastor, L. Bühler, J.M. Dumonceau, A. Hadengue, D.F. Hochstrasser, P. Lescuyer, Proteomic profiling in an animal model of acute pancreatitis, *Proteomics* 8 (2008) 3621–3631.
- O. Lassout, C.M. Pastor, V. Fétaud-Lapierre, D.F. Hochstrasser, J.L. Frossard, P. Lescuyer, Analysis of the pancreatic low molecular weight proteome in an animal model of acute pancreatitis, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 4535–4544.
- V. Fétaud-Lapierre, C.M. Pastor, A. Farina, D.F. Hochstrasser, J.L. Frossard, P. Lescuyer, Proteomic analysis of heat shock-induced protection in acute pancreatitis, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 5929–5942.
- X. Chen, M.D. Sans, J.R. Strahler, A. Karnovsky, S.A. Ernst, G. Michailidis, P.C. Andrews, J.A. Williams, Quantitative organellar proteomics analysis of rough endoplasmic reticulum from normal and acute pancreatitis rat pancreas, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 885–896.
- R. Chen, T.A. Brentnall, S. Pan, K. Cooke, K.W. Moyest, Z. Lane, D.A. Crispin, D.R. Goodle, R. Aebbersold, Quantitative proteomics analysis reveals that proteins differentially expressed in chronic pancreatitis are also frequently involved in pancreatic cancer, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 1331–1342.
- N. Sarmiento, C. Sánchez-Bernal, M. Ayra, N. Pérez, A. Hernández-Hernández, J.J. Calvo, J. Sánchez-Yagüe, Changes in the expression and dynamics of SHP-1 and SHP-2 during cerulein-induced acute pancreatitis in rats, *Biochim. Biophys. Acta* 1782 (2008) 271–279.
- N. Sarmiento, J. Sánchez-Yagüe, P.P. Juanes, N. Pérez, L. Ferreira, V. García-Hernández, A. Mangas, J.J. Calvo, C. Sánchez-Bernal, Changes in the morphology and lability of lysosomal subpopulations in caerulein-induced acute pancreatitis, *Dig. Liver Dis.* 43 (2011) 132–138.
- M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen, M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2856–2860.
- A. Hernández-Hernández, M. Llanillo, M.C. Rodríguez, F. Gómez, J. Sánchez-Yagüe, Amphiphilic and hydrophilic nature of sheep and human platelet phosphotyrosine phosphatase forms, *Biochim. Biophys. Acta* 1419 (1999) 195–206.
- A. Hernández-Hernández, M.C. Rodríguez, A. López-Revuelta, J.I. Sánchez-Gallego, V. Shnyrov, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe, Alterations in erythrocyte membrane protein composition in advanced non-small cell lung cancer, *Blood Cell Mol. Dis.* 36 (2006) 355–363.
- I. Romero-Calvo, B. Ocón, P. Martínez-Moya, M.D. Suárez, A. Zarzuelo, O. Martínez-Augustin, F.S. de Medina, Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots, *Anal. Biochem.* 401 (2010) 318–320.
- M.P. de la Cadena, A.M. Rodríguez-Pineiro, P. Alvarez-Chaver, V.S. Martínez-Zorzano, F.J. Rodríguez-Bercoval, Relevance of protein isoforms in proteomic studies, *Curr. Proteomics* 4 (2007) 235–252.
- J.J. Enghild, G. Salvesen, I.B. Thøgersen, S.V. Pizzo, Proteinase binding and inhibition by the monomeric α -macroglobulin rat α 1-inhibitor-3, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11428–11425.
- J.H. Yu, S.Y. Yun, J.W. Lim, H. Kim, K.H. Kim, Mass spectrometry and tandem mass spectrometry analysis of rat mitochondrial ATP synthase: Up-regulation in pancreatic acinar cells treated with cerulein, *Proteomics* 3 (2003) 2437–2445.

- [31] W. Halangk, M.M. Lerch, B. Brandt-Nedelev, W. Roth, M. Ruthenbueger, T. Reinheckel, W. Domschke, H. Lippert, C. Peters, J. Deussing, Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 773–781.
- [32] T. Wartmann, J. Mayerle, T. Kähne, M. Sahin-Tóth, M. Ruthenbueger, R. Matthias, A. Kruse, T. Reinheckel, C. Peters, F.U. Weiss, M. Sendler, H. Lippert, H.U. Schulz, A. Aghdassi, A. Dummer, S. Teller, W. Halangk, M.M. Lerch, Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice, *Gastroenterology* 138 (2010) 726–737.
- [33] P. Jonsson, I. Ljungcrantz, K. Ohlsson, Prevention of trypsin-induced shock in rats by the pancreatic secretory trypsin inhibitor, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 54 (1994) 595–599.
- [34] Y. Nagashio, H. Ueno, M. Imamura, H. Asami, S. Watanabe, T. Yamaguchi, M. Taguchi, M. Tashiro, M. Otsuki, Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice, *Lab. Invest.* 84 (2004) 1610–1618.
- [35] P.K. Datta, H.L. Moses, STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 3157–3167.
- [36] S.K. Halder, G. Anumanthan, R. Maddula, J. Mann, A. Chytil, A.L. Gonzalez, M.K. Washington, H.L. Moses, R.D. Beauchamp, P.K. Datta, Oncogenic function of a novel WD-domain protein, STRAP, in human carcinogenesis, *Cancer Res.* 66 (2006) 6156–6166.
- [37] H. Jung, H.A. Seong, R. Manoharan, H. Ha, Serine-threonine kinase receptor-associated protein inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 function through direct interaction, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 54–70.
- [38] J. Pereda, L. Sabater, L. Aparisi, J. Escobar, J. Sandoval, J. Viña, G. López-Rodas, J. Sastre, Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 2775–2787.
- [39] S.G. Rhee, H.Z. Chae, K. Kim, Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 1543–1552.
- [40] A. Bast, G. Wolf, I. Oberbäumer, R. Walther, Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells, *Diabetologia* 45 (2002) 867–876.
- [41] H. Nakamura, Thioredoxin as a key molecule in redox signaling, *Antioxid. Redox Signal.* 6 (2004) 15–17.
- [42] S. Ohashi, A. Nishio, H. Nakamura, M. Kido, S. Ueno, N. Uza, S. Inoue, H. Kitamura, K. Kiriya, M. Asada, H. Tamaki, M. Matsuura, K. Kawasaki, T. Fukui, N. Watanabe, H. Nakase, J. Yodoi, K. Okazaki, T. Chiba, Protective roles of redox-active protein thioredoxin-1 for severe acute pancreatitis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (2006) G772–G781.
- [43] S. Ohashi, A. Nishio, H. Nakamura, M. Asada, H. Tamaki, K. Kawasaki, T. Fukui, J. Yodoi, T. Chiba, Overexpression of redox-active protein thioredoxin-1 prevents development of chronic pancreatitis in mice, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 1835–1845.
- [44] R.T. Ethridge, R.A. Ehlers, M.R. Hellmich, S. Rajaraman, B.M. Evers, Acute pancreatitis results in induction of heat shock proteins 70 and 27 and heat shock factor-1, *Pancreas* 21 (2000) 248–256.
- [45] J.I. Frossard, L. Bhagat, H.S. Lee, A.J. Hietaranta, V.P. Singh, A.M. Song, M.L. Steer, A.K. Saluja, Both thermal and non-thermal stress protect against caerulein-induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas, *Gut* 50 (2002) 78–83.
- [46] A. Saluja, S. Hashimoto, M. Saluja, R.E. Powers, J. Meldolesi, M.L. Steer, Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during cerulein-induced pancreatitis, *Am. J. Physiol.* 253 (1987) G508–G516.

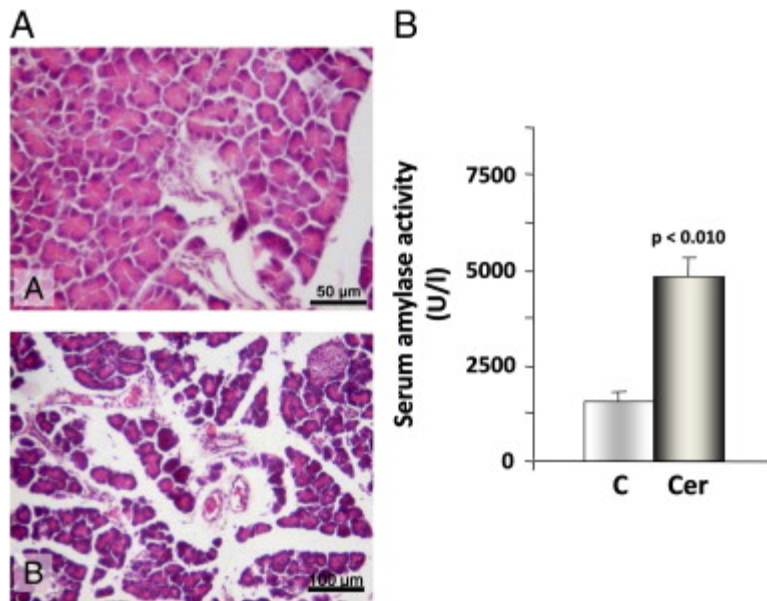


Fig. 1.. Light microscopy of the rat pancreas stained with hematoxylin & eosin (A) and serum amylase activity (B) during the early phase of cerulein (Cer)-induced acute pancreatitis. Rats were either administered saline (0.9% NaCl; control, C) or treated with Cer, as indicated in the “Materials and methods” section, and then killed 2 hours after the first injection of Cer. A, control animal (photomicrograph A), low magnification of the pancreas showing a normal morphology; 2-hour (photomicrograph B) pancreatitis rat. Compare the morphology of acini and increased degree of leukocyte infiltration. B, data are the means \pm SD of 8 animals.

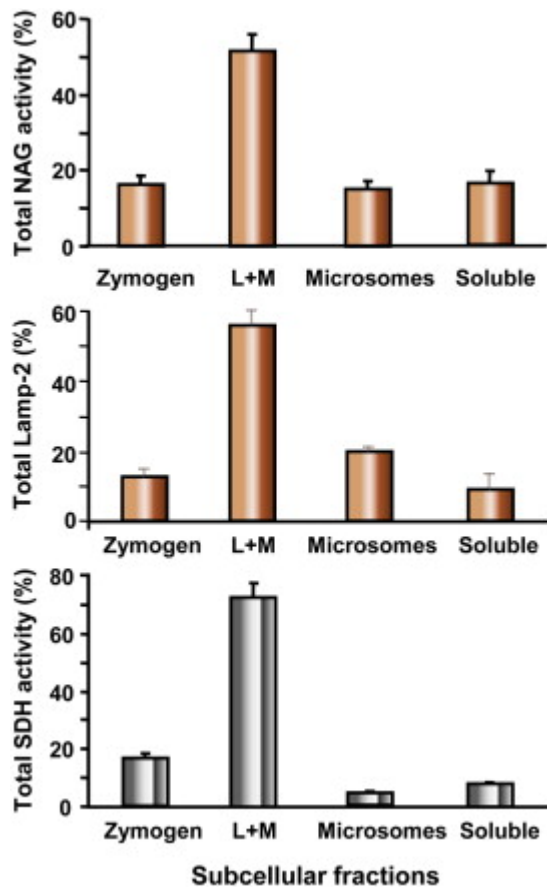


Fig. 2.. Percentage distribution of lysosomal marker enzyme N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), lysosomal protein Lamp-2 (panel B), and mitochondrial marker enzyme succinate dehydrogenase (SDH) in subcellular fractions from pancreas of control rats. NAG and SDH were assayed as indicated before (Reference 22). Lamp-2 was determined by Western blotting. The quantification of activity (NAG and SDH) or expression (Lamp-2) is shown as relative percentages considering the sum of the enzyme activities or integrated densities for all subcellular fractions in the whole pancreas as 100%.

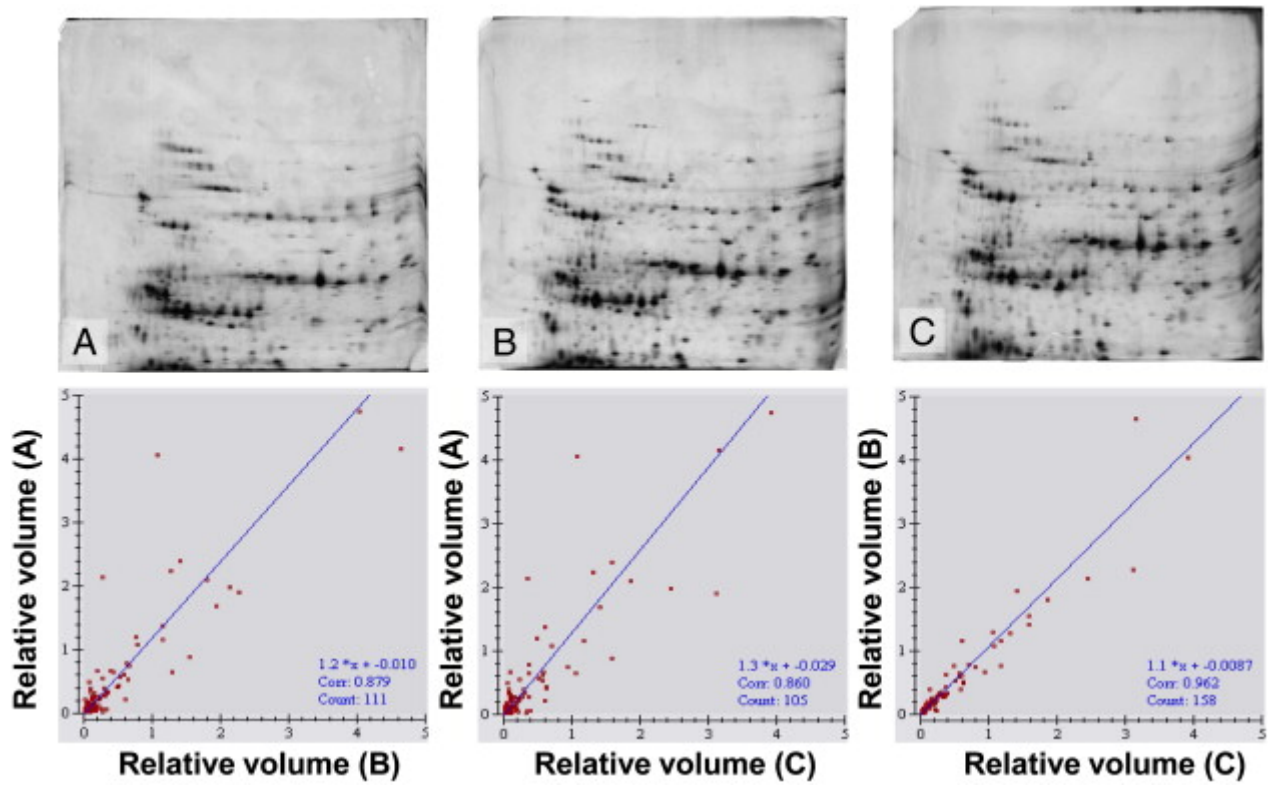


Fig. 3.. Three 2-DE maps from the same randomly chosen sample (pancreatic L + M fraction from a control rat) in different runs and scatter plots for matched spots showing correlation coefficients.

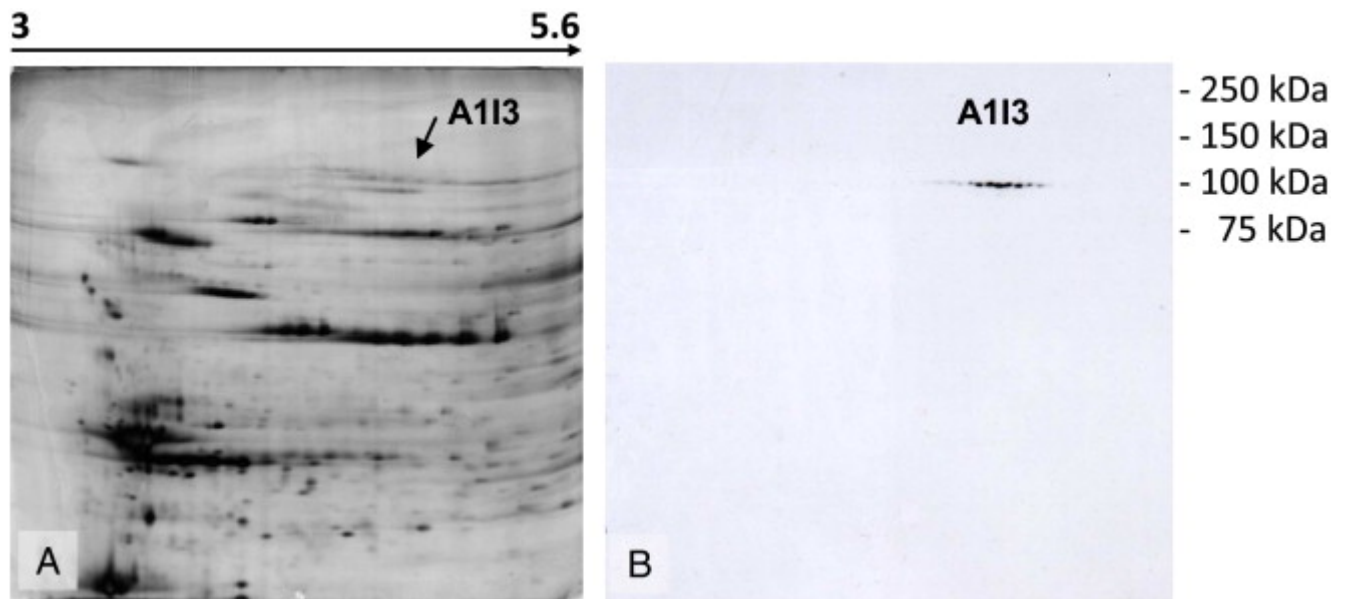


Fig. 4.. 2-DE map of pancreatic soluble fraction from a control rat (A) and Western blotting of A113 (B). Duplicate samples of the proteins were subjected to isoelectric focusing (18-cm IPG strips, pH 3-5.6) and molecular weight separation. A 2-DE gel (A) was silver stained to visualize all proteins, and a blot (B) immunostained to visualize A113 spots.

Supporting Information 4

Mascot Search Results

Protein View

A113. N-t fragment

Spot 9 (Fig. 1)

Match to: **gi|83816939** Score: **717** Expect: **1.3e-067**
alpha-1-inhibitor 3 precursor [Rattus norvegicus]

Nominal mass (M_r): **165038**; Calculated pI value: **5.70**
NCBI BLAST search of gi|83816939 against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **18%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1	MKKDREAQLC	LFSALLAFLP	FASLLNGNSK	YMLVPSQLY	TETPEKICLH
51	LYHLNETVTV	TASLISQRGT	RKLFDELVVD	KDLFHCVSFT	IPRLPSSEEE
101	ESLDINIEGA	KHKFSERRVV	LVKNKESVVF	VQTDKPMYKP	GQSVKFRVVS
151	MDKNLHPLNE	LFPLAYIEDP	KMNRIMQWQD	VKTENGLKQL	SFSLSAEPIQ
201	GPYKIVILKQ	SGVKEEHSFT	VMEFVLPFRG	VDVKVPNAIS	VYDEIINVT
251	CATYTYGKPV	PGHVK ISLCH	GNPTFSSETK	SGCKEEDSRL	DNNGCSTQEV
301	NITEFQLKEN	YMKMHQAFHV	NATVTEEGTG	SEFSGSGRIE	VERTR NKFLF
351	LKADSHFRHG	IPFFVKVRLV	DIKGDPIPNE	QVLIKARDAG	YTNATTTDQH
401	GLAK FSIDTN	GISDYSLNK	VYHKEESSCI	HSSCTAERHA	EAHHTAYAVY
451	SLSKSYIYLD	TEAGVLPNCQ	IHTVQAHFIL	KGQVLGVLQQ	IVFHYLVMAQ
501	GSILQGTGNT	HQVEPGESQV	QGNFALEIPV	EFSMVPVAKM	LIYITILPDGE
551	VIADSVKFKQV	EKCLR NKVHL	SFSPSLSLPA	SQTHMRVTAS	PQSLCGLRAV
601	DQSVLLQKPE	AELSPSLIYD	LPGMQDSNFI	ASSNDPFEDE	DYCLMYQPIA
651	REKDVYRYVR	ETGLMAFTNL	KIKLPTYCNT	DYDMVPLAVP	AVALDSSTR
701	GMYESLPVVA	VKSPLPQEP	RKDPKDPV	IETIRNYFPE	TWIWDLVTN
751	SSGVTELEMT	VPTTITEWKA	GALCLSDNTG	LGLSSVASFQ	AFQPPFVELT
801	MPYSVIRGEA	FTLKATVLNY	LPTSLPMAVL	LEASPDFTAV	PVENNQDSYC
851	LGANGRHTSS	WLVTPKSLGN	VNFSVSAEAR	QSPGPGSEV	ATVPETGRKD
901	TVVKVLIVEP	EGIKKEHTFS	SLLCASDAEL	SETLSLLLPP	TVVKDSARAH
951	FVSMGDILSS	AIKNTQNLIQ	MPYGCGEQNM	VLFPAPNIYVL	KYLNETQQLT
1001	EKIKSKALGY	LRAGYQRELN	YKHKDGSYSA	FGDHNGQGQG	NTWLTAFVLK
1051	SFAQARAFIF	IDESHITDAF	TWLSKQKQDS	GCFRSSGSL	NNAMKGGVDD
1101	EITLSAYITM	ALLESSLPDT	DPVVSALSC	LESSWENIEQ	GGNGSFVYTK
1151	ALMAYAFALA	GNQEKRNEIL	KSLDKAEIKE	DNSIHWERPQ	KPTKSEGYLE
1201	TPQASSAEVE	MSAYVVLARL	TAQPAPSPED	LALSMGTIKW	LTKQQNSYGG
1251	FSSTQDTVVA	LDALSKYGAA	TFSKSKQTPS	VTVQSSGSFS	QKFQVDKSNR
1301	LLLQQVSLPY	IPGNYTVSVS	GEGCVYAQTT	LRYNVPLEKQ	QPAFALKVQT
1351	VPLTCNNPKG	QNSFQISLEI	SYMGRPASN	MVIADVCMLS	GFIPKPTVK
1401	KLERLGHVSR	TEVTNNVLL	YLDQVTNQT	SFSFIIQQDI	PVKNLQPAIV
1451	KVYDYETDE	VAFAEYSSPC	SDDQNV		

A113. C-t fragment

Spot 1 (Fig. 1)

Match to: **P14046** Score: **659** Expect: **4.4e-061**
Alpha-1-inhibitor 3 precursor - Rattus norvegicus (Rat)

Nominal mass (M_r): **165038**; Calculated pI value: **5.70**
NCBI BLAST search of P14046 against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **17%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1	MKKDREAQLC	LFSALLAFLP	FASLLNGNSK	YMVLVPSQLY	TETPEKICLH
51	LYHLNETVTV	TASLISQRGT	RKLFDELVVD	KDLFHCVSFT	IPRLPSSEEE
101	ESLDINIEGA	KHKFSERRVV	LVKNKESVVF	VQTDKPMYKP	GQSVKFRVVS
151	MDKNLHPLNE	LFPLAYIEDP	KMNRIMQWQD	VKTENGLKQL	SFSLSAEPIQ
201	GPYKIVILKQ	SGVKEEHSFT	VMEFVLPRFG	VDVKVPNAIS	VYDEIINVTA
251	CATYTYGKPV	PGHVKISLCH	GNPTFSSETK	SGCKEEDSRL	DNNGCSTQEV
301	NITEFQLKEN	YMKMHQAFHV	NATVTEEGTG	SEFSGSGRIE	VERTRNKFLF
351	LKADSHFRHG	IPFFVKVRLV	DIKGDPIPNE	QVLIKARDAG	YTNATTTDQH
401	GLAKFSIDTN	GISDYSLNK	VYHKEESSCI	HSSCTAERHA	EAHHTAYAVY
451	SLSKSYIYLD	TEAGVLPENQ	IHTVQAHFIL	KGQVLGVLQQ	IVFHLYLVMAQ
501	GSILQTNHT	HQVEPGESQV	QGNFALEIPV	EFMVPVAKM	LIYTIILPDGE
551	VIADSVKFQV	EKCLRNVHL	SFSPSQSLPA	SQTHMRVTAS	PQSLCGLRAV
601	DQSVLLQKPE	AELSPSLIYD	LPGMQDSNFI	ASSNDPFED	DYCLMYQPIA
651	REKDVYRYVR	ETGLMAFTNL	KIKLPTYCNT	DYDMVPLAVP	AVALDSSTDR
701	GMYESLPVVA	VKSPLPQEP	RK DPKDPV	IETIRNYFPE	TWIWDLVTVN
751	SSGVTELEMT	VPDTITWKA	GALCLSNDTG	LGLSSVASFQ	AFQPFVVELT
801	MPYSVIRGEA	FTLKATVLNY	LPTSLEPMAVL	LEASPDFTAV	PVENNQDQSYC
851	LGANGR HTSS	WL VTPKSLGN	VNFSVSAEAR	QSPGPCGSEV	ATVPETGRKD
901	TVVK VLIV EP	EGIKKEHTFS	SLLCASDAEL	SETLSLLLPP	TVVKDSAR AH
951	FV MGDIL SS	AIKNTQNL IQ	MPYGCGEQNM	VLFAPNIYVL	KYLNETQQLT
1001	EKIKSKALGY	LRAGYQRELN	YKHK DGSYSA	FGDHNGQGQ	NTWLTAFVLK
1051	SFAQARAFIF	IDESHITDAF	TWLSKQQKDS	GCFRSSGSL	NNAMKGGVDD
1101	EITLSAYITM	ALLESSLPDT	DPVVSALSC	LESSWENIEQ	GGNGSFVYTK
1151	ALMAYAFALA	GNQEK RNEIL	KSLDK EAIKE	DNSIHWERPQ	KPTKSEGYLY
1201	TPQASSAEVE	MSAYV LARL	TAQPAPSPED	LALSMGTIKW	LTK QQNSYGG
1251	FSSTQDTVVA	LDALSKYGAA	TFSKSQ KTPS	VTVQSSGSFS	QK FQVDKSNR
1301	LLLQVSLPY	IPGNYTVSVS	GEGCVYAQTT	LRYNVPLEK Q	QPAFALKVQT
1351	VPLTCNNPKG	QNSFQISLEI	SYMGSRPASN	MVIADVK MLS	GFIPLKPTVK
1401	KLERLGHVSR	TEVTTNNVLL	YLDQVTNQTL	SFSFIIQQDI	PVKNLQPAIV
1451	KVYDYYETDE	VAFAEYSSPC	SSDDQNV		

Supporting Information 5 (L+M subcellular fraction)

Mascot Search Results

Protein View

Carboxypeptidase B1 (activation peptide: 1-108)

Spot 12 (Fig. 2)

Match to: **gi|149048541** Score: **743** Expect: **3.4e-070**
carboxypeptidase B1 (tissue), isoform CRA_b [Rattus norvegicus]

Nominal mass (M_r): **44053**; Calculated pI value: **5.50**
NCBI BLAST search of **gi|149048541** against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **38%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MLLLLALVSV ALAHASEEHF DGNRVYRVSV HGEDHVNLIQ ELANTKEIDF
51 WKPDSAKQVK PLTTVDFHVK AEDVADVENF LEENEVHYEV LISNVRNALE
101 SQFDSHTRAS GHSYTKYNKW ETIGKTRPNK PAIFIDCGFH AREWISPAFC
151 QWFVREAVRT YNQEIHMKQL LDELDFYVLP VVNIDGYVYT WTKDRMWRKT
201 RSTMAGSSCL GVDPNRNFNA GWCEVGASRS PCSETYCGPA PESEKTKAL
251 ADFIRNNLST IKAYLTIHSY SQMMLYPYSY DYKLPENYEE LNALVKGAAK
301 ELATLHGTTY TYGPGATTIY PAAGGSDDWS YDQGIKYSFT FELRDTGFFG
351 FLLPESQIRQ TCEETMLAVK YIANYVREHL Y
```

Iodothyronine 5' monodeiodinase

Spot 7 (Fig. 2)

Match to: **gi|202549** Score: **814** Expect: **2.7e-077**
iodothyronine 5' monodeiodinase [Rattus norvegicus]

Nominal mass (M_r): **54375**; Calculated pI value: **4.87**
NCBI BLAST search of **gi|202549** against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **37%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 VLVLKKSNFA EALAAHNYLL VEFYAPWCGH CKALAPEYAK AAAKLKAEGS
51 EIRLAKVDAT EESDLAQQYG VRGYPTIKFF KNGDTASPKE YTAGREADDI
101 VNWLKKRTGP AATTLSDTAA AESLVDSSEV TVIGFFKDAG SDSAKQFLLA
151 AEAVDDIPFG ITSNSDVFSK YQLDKDGVVL FKKFDEGRNN FEGEITKEKL
201 LDFIKHNQLP LVIEFTEQTA PKIFGGEIKT HILLFLPKSV SDYDGKLSNF
251 KKAAEGFKGK ILFIFIDSDH TDNQRILEFF GLKKEECPAV RLITLEEEMT
301 KYKPESDELT AEKITQFCHH FLEGKIKPHL MSQELPEDWD KQPVKVLVGK
351 NFEEVAFDEK KNVFVEFYAP WCGHCKQLAP IWDKLGETYK DHENIVIAKM
401 DSTANEVEAV KVHSFPTLKF FPASADRTVI DYNGERTLDG FKKFLESGGQ
451 DGAGDNDDLD LEEALEPDME EDDDQKAVKD EL
```

Iodothyronine 5' monodeiodinase fragments

Spot 11 (Fig. 2)

Match to: **gi|202549** Score: **462** Expect: **4.2e-042**
iodothyronine 5' monodeiodinase [Rattus norvegicus]

Nominal mass (M_r): **54375**; Calculated pI value: **4.87**
NCBI BLAST search of **gi|202549** against **nr**
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: **Rattus norvegicus**

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: **25%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 VLVLKKSNFA EALAAHNYLL VEFYAPWCGH CKALAPEYAK AAAKLKAEGS
51 EIRLAKVDAT EESDLAQQYG VRGYPTIKFF KNGDTASPKE YTAGREADDI
101 VNWLKKRTGP AATTLSDTAA AESLVDSSEV TVIGFFKDAG SDSAKQFLLA
151 AEAVDDIPFG ITSNSDVFSK YQLDKDGVVL FKKFDEGRNN FEGEITKEKL
201 LDFIKHNQLP LVIEFTEQTA PKIFGGEIKT HILLFLPKSV SDYDGKLSNF
251 KKAAEGFKGK ILFIFIDSDH TDNQRILEFF GLKKEECPAV RLITLEEEMT
301 KYKPESDELT AEKITQFCHH FLEGKIKPHL MSQELPEDWD KQPVKVLVGK
351 NFEEVAFDEK KNVFVEFYAP WCGHCKQLAP IWDKLGETYK DHENIVIAKM
401 DSTANEVEAV KVHSFPTLKF FPASADRTVI DYNGERTLDG FKKFLESGGQ
451 DGAGDNDDLD LEEALEPDME EDDDQKAVKD EL
```

Spot 13 (Fig. 2)

Match to: **gi|202549** Score: **518** Expect: **1.1e-047**
iodothyronine 5' monodeiodinase [Rattus norvegicus]

Nominal mass (M_r): **54375**; Calculated pI value: **4.87**
NCBI BLAST search of **gi|202549** against **nr**
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 23%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 VLVLKKSNTFA EALAAHNYLL VEFYAPWCGH CKALAPEYAK AAAKLKAEGS
51 EIRLAKVDAT EESDLAQQYG VRGYPTIKFF KNGDTASPKE YTAGREADDI
101 VNWLKRTGP AATLSDTAA AESLVDSEV TVIGFFKDAG SDSAKQFLLA
151 AEAVDDIPFG ITSNSDVFSK YQLDKDGVVL FKKFDEGRNN FEGEITKEKL
201 LDFIKHNQLP LVIEFTEQTA PKIFGGEIKT HILLFLPKSV SDYDGKLSNF
251 KKAATEGFKGK ILFIFIDSDH TDNQRILEFF GLKKEECPAV RLITLLEEEMT
301 KYKPESDELT AEKITQFCHH FLEGKIKPHL MSQELPEDWD KQPVKVLVVGK
351 NFEEVAFDEK KNVFVEFYAP WCGHCKQLAP IWDKLGETYK DHENIVIAKM
401 DSTANEVEAV KVHSFPTLKF FPASADRTVI DYNGERTLDG FKKFLESGGQ
451 DGAGDNDDL D LEEALEPDME EDDDQKAVKD EL
```

actin, γ 1 propeptide-like

Spot 9 (Fig. 2)

Match to: [gi|293342999](#) Score: 290 Expect: 6.7e-025

PREDICTED: **actin, gamma 1 propeptide-like [Rattus norvegicus]**

Nominal mass (Mr): 42109; Calculated pI value: 5.31

NCBI BLAST search of [gi|293342999](#) against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Rattus norvegicus

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI

Entrez:

[gi|293354862](#) from Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 25%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MEEEIAALVI DNGSGMCKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH QGVMVGMGQK
51 DSYVGDEAQS KRGILTLKYP NEHGIVTNWD DMEKIWHHTF YNELRVAPEE
101 HPVLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNTF AMYVAIQAVL SLYASGRTTG
151 IVMDSGDGVT HTVPIYEGYA LPHAILRLDL AGRDLTDYLM KILTERGYSF
201 TTTAEREIVR DIKEKLCYVA LDFEQEMATA ASSSSLEKSY ELPDGQVITI
251 GNERFRCPEA LFQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR KDLYANTVLS
301 GGTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW IGGASILASLS
351 TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF
```

2.

Objetivo 2:

Estudiar los cambios de expresión de la proteína lisosómica LIMP-2 durante la PA-inducida por Cer, así como el efecto que tiene sobre dicha expresión la inhibición de la infiltración, los niveles de AMPc y las MAPKs.



Changes in the expression of LIMP-2 during cerulein-induced pancreatitis in rats: Effect of inhibition of leukocyte infiltration, cAMP and MAPKs early on in its development



Violeta García-Hernández^a, Nancy Sarmiento^a, Carmen Sánchez-Bernal^a, Rafael Coveñas^b, Angel Hernández-Hernández^a, José J. Calvo^c, Jesús Sánchez-Yagüe^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, IBSAL (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca), Spain

^b Institute of Neurosciences of Castilla y León (INCYL), University of Salamanca, Spain

^c Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, IBSAL (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2015

Received in revised form

28 December 2015

Accepted 15 January 2016

Available online 18 January 2016

Keywords:

LIMP-2

Infiltration inhibition

MAPK inhibition

Cerulein

Experimental acute pancreatitis

ABSTRACT

Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2) is an important protein in lysosomal biogenesis and function and also plays a role in the tissue inflammatory response. It is known that lysosomes play a central role in acute pancreatitis, with inflammatory cell infiltration triggering the disease early on. In this study we report increases in pancreatic LIMP-2 protein and mRNA levels as early events that occur during the development of cerulein (Cer)-induced acute pancreatitis (AP) in rats. GdCl₃, a macrophage inhibitor, but not FK506, a T lymphocyte inhibitor, was able to reverse the increase in LIMP-2 expression after Cer treatment, although such reversion was abolished if the animals were depleted of neutrophils due to a vinblastine sulfate pre-treatment. Immunostaining revealed that the cellular source of LIMP-2 was mainly acinar cells. Additionally, pre-treatments with the MAPKs inhibitors SP600125 and PD98059, inhibitors of JNK and ERK1/2 activation, respectively, but not of rolipram, a type IV phosphodiesterase inhibitor, suppressed the increase in the expression of LIMP-2 after Cer administration. Together, these results indicate that neutrophils are able to drive a macrophage activation that would regulate the increase in LIMP-2 expression during the early phase of Cer-induced AP, with the stress kinases JNK and ERK1/2 also playing a coordinated role in the increase of LIMP-2 expression due to Cer.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pancreatitis is an auto-digestive disease that damages acinar cells and causes severe inflammation in which lysosomes play a central role (Saluja et al., 1999). It is reasonable to assume that the development of pancreatitis may be based on rapid early events. One of the animal models of human edematous pancreatitis is that which is induced by cerulein (Cer) in the rat. The treatment used in the model of acute pancreatitis (AP) within the present studies results in a series of manifestations of pancreatitis, including interstitial edema and hyperamylasemia, different indicators of morphological and histological damage to the pancreas, and neutrophil infiltration (Alonso et al., 1994; Pescador et al., 1995; Sarmiento et al., 2010; Yönetçi et al., 2001; Zhao et al., 2007). Also,

Cer-induced AP activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade (García-Hernández et al., 2014; Minutoli et al., 2004) and the adenosine A1-receptor pathway (Satoh et al., 2000), which decreases intracellular cAMP levels.

To carry out the transport of materials, the maintenance of an acidic lumen, and the fusion with other membrane-bound organelles, the lysosomal membrane contains at least 100 lysosomal membrane proteins. LIMP-2 (lysosomal integral membrane protein-2), also called LGP85, is a ubiquitous major type III lysosomal transmembrane protein that is extensively glycosylated in its large luminal region. The molecular mass of the polypeptide backbone is around 55 kDa, but after glycosylation its mass increases up to almost 85 kDa (Fujita et al., 1991), depending on the cell type and organism. Lysosomal LIMP-2 function has been only partially defined. However, its role in general lysosomal maintenance is supported by experiments showing that LIMP-2 overexpression in different cell lines results in swollen vacuoles and impaired trafficking out of the enlarged early/late endosomes and lysosomes (Kuronita et al., 2002). LIMP-2 also promotes fusion of lysosomes with endosomes (Desmond et al., 2011). A role as a receptor for

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Departamental. Lab. 102, Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007 Salamanca, Spain.

E-mail address: sanyaj@usal.es (J. Sánchez-Yagüe).

glucocerebrosidase (Reczek et al., 2007) as well as for several enteroviruses (Yamayoshi et al., 2012), and an influence in the binding affinity of N-cadherin and β -catenin among cardiomyocytes (Schroen et al., 2007) have also been reported. In addition, recent experiments using mice with deficiency of LIMP-2 show reduced inflammation in experimental crescentic glomerulonephritis with decreased macrophage and T-cell infiltration in the kidney, suggesting an important role for LIMP-2 in mediating the inflammatory response (Lee et al., 2014). It is known that the infiltration of inflammatory cells into the pancreas is an early, central and trigger event in AP (Sandler et al., 2013). This infiltration causes local and systemic injury in the disease, and neutrophils, monocytes, macrophages and even lymphocytes are involved in the development of acute experimental pancreatitis (Vonlaufen et al., 2007).

Bearing in mind the importance of unmasking the molecules or genes whose expression changes early on in the development of AP, the importance of lysosomes in AP development and the new role of LIMP-2 in inflammation, the goal of the present work was to study the expression of LIMP-2 from the early phase of Cer-induced AP and the influence of different inflammatory cells in such expression. To achieve this we used vinblastine sulfate, which elicits a neutropenic state, gadolinium chloride ($GdCl_3$), which inactivates macrophage activity, and FK506 (tacrolimus) an immunomodulatory drug that preferentially decreases T-lymphocyte proliferation. Lastly, we analyzed some of the signaling mechanisms that modulate LIMP-2 expression in AP by using the MAPK inhibitors SP600125 and PD98059, and rolipram, a type IV phosphodiesterase inhibitor that increases cAMP levels.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Bovine serum albumin (BSA), Cer, dithiothreitol (DTT), FK506, gadolinium chloride ($GdCl_3$), phenylmethylsulfonyl fluoride, PD98059, Protein Inhibitor Cocktail, rolipram, soybean trypsin inhibitor, SP600125, Trizol Reagent and vinblastine sulfate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were obtained from GE Healthcare, Spain. LIMP II (C-18) polyclonal antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA. LAMP-2 polyclonal antibody was obtained from Zymed Laboratories Inc. (Invitrogen, Carlsband, CA, USA). Monoclonal antibody anti-GAPDH was acquired from Ambion, Inc., Applied Biosystems, Madrid, Spain. Reverse Transcriptase (RevertAid M-MULV), Taq polymerase, dNTP's and the Ribolock Ribonuclease inhibitor used in the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were purchased from Fermentas Life Sciences, Germany. Oligonucleotides were obtained from Isogen life Sciences, The Netherlands. The Myeloperoxidase (MPO) Peroxidation Assay Kit was purchased from Cayman Chemical Company, MI, USA. Isopropanol was purchased from Panreac, Spain.

2.2. Animals

Experiments were performed on male Wistar rats weighing 250–280 g obtained from the University of Salamanca's breeding colony. Rats were housed in rooms maintained at $22 \pm 1^\circ C$ using a 12-h light/dark cycle. Animals were fasted overnight before the experiment but had free access to water. Animals were handled in accordance with the procedures outlined in European Community guidelines on ethical animal research (86/609/EEC), and protocols were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca.

2.3. Induction of AP and preparation of samples

AP was induced as previously described (Sarmiento et al., 2008). Briefly, rats received 2 or 4 subcutaneous injections of 20 μg Cer/kg body weight or its vehicle (0.9% NaCl) at hourly intervals. At 2, 4 or 9 h after the first injection, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg), blood samples were taken from the tail and by cardiac puncture and the animals were then killed. Blood serum was stored at $-80^\circ C$ until amylase determination. The pancreata were rapidly harvested, dissected out from the surrounding fat tissue and lymph nodes and their wet weights rapidly measured. A small portion of tissue was used for histological studies. The remaining parts of the pancreata were homogenized individually (García-Hernández et al., 2014) and post-nuclear homogenates of each pancreas were obtained as previously described (Sarmiento et al., 2011).

2.4. Light microscopy and immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissue sections (8–10 μm thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E staining), as indicated previously (Sarmiento et al., 2010). For estimation of the neutrophil amount in H&E staining, neutrophil number was evaluated in at least 15 sequentially fields at a magnification of 40 \times in 10 sections of each rat. The immunostaining procedure was done according to García et al. (2009). Briefly, the animals were perfused by infusion of 200–350 ml of cold 4% paraformaldehyde in 0.15 M PBS (pH 7.2). The pancreata were cryoprotected and using a cryostat, 15- μm frontal sections were cut. Sections were treated with a mixture of methanol/ H_2O_2 (2:1) (to avoid possible interference by endogenous peroxidase), incubated in 0.15 M PBS with 0.3% Triton-X 100 and 1% horse serum (PBST-serum), and finally incubated with anti-LIMP II polyclonal antibody diluted 1:50 in PBST-serum. After washing, sections were incubated with 1:100 biotinylated anti-goat IgG antibody and then with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) reagent. Labeling specificity was assessed by (1) omission of the primary antiserum, (2) omission of the biotinylated antibody, and (3) omission of ABC reagent. In all the cases no immunoreactivity was found.

2.5. Serum amylase determination

Serum amylase was measured with a Gernon Star Modular Analyzer, using a RAL assay kit (RAL, Barcelona, Spain), as previously reported (Sarmiento et al., 2008).

2.6. White blood cell (WBC) depletion and count

White blood cell depletion and count was done as previously described (García-Hernández et al., 2014). Briefly, vinblastine sulfate or its vehicle (0.9% NaCl) was administered to rats intravenously (i.v.) at a dose of 0.75 mg/kg on day 1. At this dosage, the animals became neutropenic between days 4 and 6 (Clemons et al., 2002). On day 5, after the induction of neutropenia, the animals were treated with 4 hourly-injected doses of Cer (20 μg Cer/kg) to induce AP. FK506 (0.3 mg/kg body weight) or its vehicle (0.9% NaCl) was administered to rats subcutaneously 24 and 48 h before the induction of the pancreatitis. $GdCl_3$ (1 mg/100 g of body weight) or its vehicle (0.9% NaCl) was injected into the rat tail vein 24 h before the start of Cer or saline administration. Whole WBC and neutrophils were counted by flow cytometry using a Sysmex XT-2000i automated hematology analyzer. Differential WBC counts were done using peripheral blood smears stained using the May–Grünwald–Giemsa method. One hundred cells/blood samples were counted to obtain the leukocyte formula.

2.7. Inhibition of type IV phosphodiesterase by rolipram or of MAPKs by SP600125 and PD98059 in Cer-induced AP

Inhibition of the different signaling enzymes was achieved as previously reported (García-Hernández et al., 2014). Briefly, rats received intraperitoneal (i.p.) injections of rolipram (5 mg/kg), PD98059 (5 mg/kg), SP600125 (15 mg/kg) or its vehicle [1 ml/kg of a 10% DMSO/NaCl solution (SP600125 and rolipram) or 1% Pluronic F-68 in DMSO (PD98059)] both 30 min before and 30 min after (rolipram), 1 h before (PD98059), or 2 h before and 30 min after (SP600125) the first Cer injection. Thirty minutes, 1 h or 2 h after the first injection of rolipram, PD98059 or SP600125, respectively, the rats were injected subcutaneously with Cer (20 µg Cer/kg) or its vehicle (0.9% NaCl) at hourly intervals. The animals were sacrificed 2 h after the first Cer injection (early phase of Cer-induced AP).

2.8. Myeloperoxidase (MPO) assay

MPO activity was detected in the pancreatic post-nuclear homogenates immediately after their collection using the Myeloperoxidase Peroxidation Assay Kit and following the manufacturer's instructions.

2.9. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assays

Total RNA was isolated from the pancreas and brain of the same rat by immediate solubilization in Trizol Reagent and subsequent isopropanol purification. RT-PCR was performed in a total volume of 20 µl containing 2 µg cDNA, 50 mM Tris/HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM deoxynucleoside triphosphates, 0.5 µM of each primer, 20 units of Ribolock ribonuclease inhibitor and 200U RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase. The LIMP-2 oligonucleotide sequences were as follows: forward oligo: 5'-ATAAAAGGCATGCGTCCAAACAAGG-3'; reverse oligo: 5'-TGCTGCGGCTTCACTCCCTTCT-3'. Product length was 507 bp. Oligonucleotide primers for β-actin were used as an internal control (forward oligo: 5'-TCTGTGGATTGGTGGCTCTA-3'; reverse oligo: 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'). Oligonucleotide design was performed with the PrimerSelect program (DNASTAR). Oligonucleotide sequences were subjected to BLAST search to avoid spurious similarities. Cycle steps were performed as previously described (Sarmiento et al., 2008).

2.10. SDS-PAGE and Western blotting

Protein concentrations were assayed by the Bradford method (Bradford, 1976), using BSA as a standard. Special care was taken with this assay in order to minimize differences in the amount of proteins loaded in each lane of the SDS-PAGE gels. Quality control of the assays was ensured by repeating the test at least three times with five different volumes of three-to-five different sample dilutions. Proteins were analyzed by SDS-PAGE using 10% gels and then transferred to PVDF membranes. Western blots were probed with anti-LIMP-2, anti-LAMP-2 and GAPDH polyclonal antibodies diluted 1:5000, 1:1000 and 1:40,000, respectively. Blots were visualized by chemiluminescence. Analyses of the spots on all the blots were performed as described previously (Hernández-Hernández et al., 2006). The densities corresponding to both LIMP-2 and LAMP-2 bands in the different treatments were normalized to the GAPDH band densities (used as loading controls). The images shown in the figures are from blots whose films were exposed for optimal reproduction rather than for the linearity of band densities.

2.11. Statistical analyses

Data (means ± S.D.) were analyzed (version 21.0 of the SPSS program for MS Windows, SPSS, Chicago) using the non-parametric Mann-Whitney *U* test. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Changes in the expression of LIMP-2 during the development of AP

The upper part of Fig. 1a shows representative Western blot analyses indicating LIMP-2 protein in whole post-nuclear pancreatic homogenates obtained from control or pancreatic rats at different times after the first injection of Cer. The lower part of Fig. 1a indicates quantitative data relative to an equal amount of proteins (black bars) or to the whole pancreas (open bars). As we have reported previously (Sarmiento et al., 2008, 2010), the expression data obtained from the whole pancreas gives a better interpretation of the results as pancreatitis is associated with cell death and neutrophil infiltration. These features imply that the pancreata of control and pancreatic rats have different cell compositions. Furthermore, the amount of any protein, including LIMP-2, would be more accurately calculated using the whole organ as opposed to using fixed amount of protein. Here, we observed an increase in the expression of LIMP-2 in the early phase of AP (2 h after the first injection of Cer) (2.6 ± 1.1 -fold that of controls), which persisted in the intermediate (2.8 ± 1.3 -fold that of controls) and later phase (2.1 ± 0.5 -fold that of the controls). The establishment of AP was tested by checking that serum amylase activity did indeed increase significantly along the development of pancreatitis (Fig. 1b). Also, using histological sections of pancreata (Fig. 1c), our model of pancreatitis exhibited a tissue architecture and leukocyte infiltration consistent with parameters described previously for AP (Pescador et al., 1995; Saluja et al., 1999; Sarmiento et al., 2010; Yönetçi et al., 2001). Moreover, in the early phase of AP (2 h), LIMP-2 mRNA levels were greater in pancreata but not in the control organ containing Cer receptors (brain) (Fig. 2), in which the expression of LIMP-2 protein remained constant (data not shown).

To check whether other lysosomal membrane proteins were also overexpressed in Cer-induced AP, we also examined the expression levels of LAMP-2. We observed that the pancreatic protein levels of LAMP-2 decreased dramatically from the early phase of AP (Supplementary Fig. S1). This finding is consistent with previously reported data (Gukovsky et al., 2012), and supports the notion that the increased levels of LIMP-2 do not reflect an increase in the expression of lysosomal membrane proteins in general.

Supplementary Fig. S1 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.01.010>.

3.2. Influence of white blood cell inhibitors on LIMP-2 expression

In pancreatitis, neutrophil infiltration is an important component in the development of both inflammation and cell death. Besides, the population of resident macrophages of the pancreas as well as infiltrating lymphocytes probably play a role in AP development (Vonlaufen et al., 2007). It has been reported that during the intermediate phase of AP inflammatory cell infiltration has already started or taken place (Mayerle et al., 2005), as we observed here and previously (García-Hernández et al., 2014; Sarmiento et al., 2010) in our AP model by light microscopy analysis. Therefore, we decided to perform the study 4h after the first injection of Cer. We used vinblastine sulfate to render some rats neutropenic before treatment with GdCl₃ or FK506, the latter inhibitors

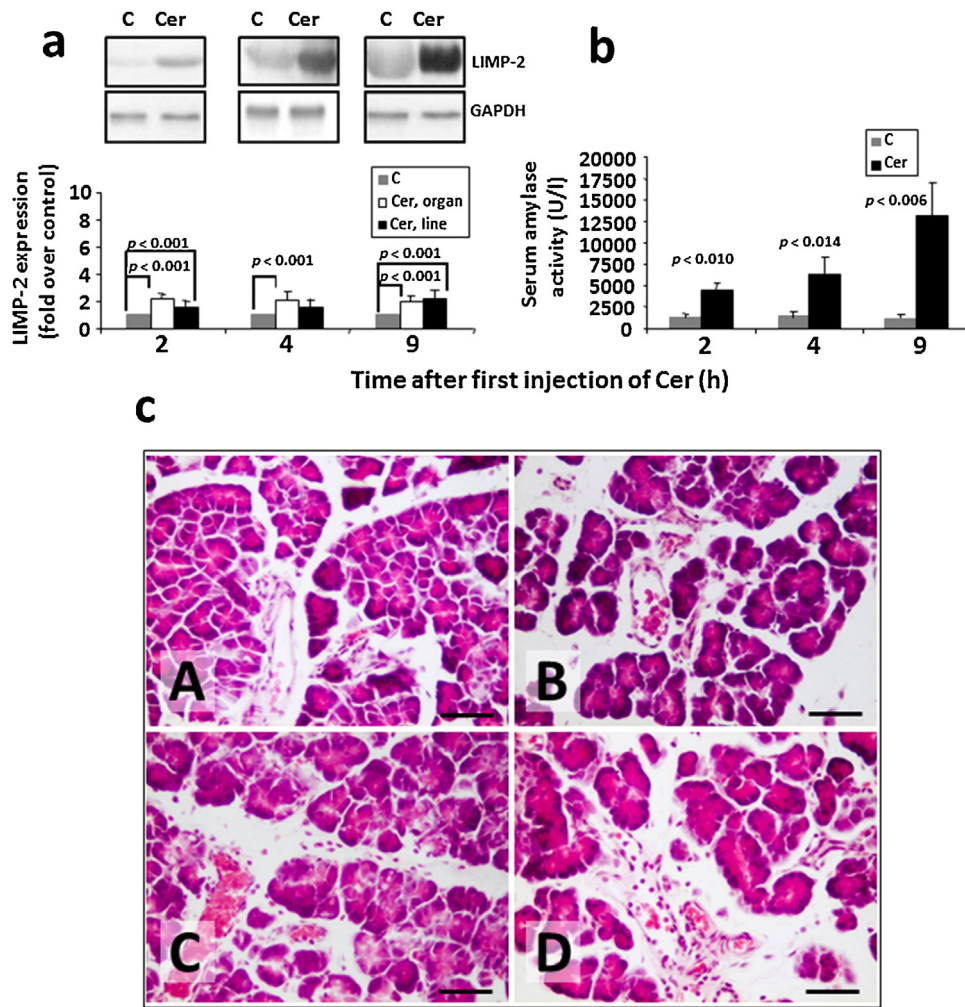


Fig. 1. Expression of LIMP-2 protein (a) and serum amylase activity (b), and light microscopy of the rat pancreas stained with H&C (c) during the development of Cer-induced AP. Rats were either administered saline (0.9% NaCl) (control, C) or treated with Cer, as indicated in Section 2, and then killed 2, 4 or 9 h after the first injection of Cer. In (a), quantification (graphic, values given as LIMP-2/GAPDH ratios, and considering control as 1) of expression (Western blots in whole post-nuclear pancreatic homogenates where one representative for each time-point is shown) was carried out per mg of protein (■) and considering the whole pancreas (□). Each lane in the blots contained 30 μ g of protein. Data are means \pm S.D. of 6 animals. In the histological pancreatic sections (H&E staining): control animal (photomicrograph A), low magnification of the pancreas showing a normal morphology; 2 h (photomicrograph B), 4 h (photomicrograph C) and 9 h (photomicrograph D) pancreatic rats. Compare the morphology of normal acini with other acini showing altered morphology. Note also the different and increasing degree of leukocyte infiltration at 2, 4 and 9 h. Scale bar: 20 μ m.

blocking macrophage or T lymphocyte activities, respectively. Blood cell counts revealed that white blood cells were reduced significantly but only in the groups pre-treated with vinblastine sulfate (4800 ± 1600^a , 5826 ± 1123^a , 5084 ± 1096^a , 2017.0 ± 410^b , 5235 ± 1301^a or 2997.0 ± 699^b , in control, Cer, GdCl₃ + Cer, Vin + GdCl₃ + Cer, FK506 + Cer or Vin + FK506 + Cer, respectively; non coincident superscripts letters: $p < 0.05$). As expected, the same outcome was detected in the percentage of neutrophils (21.9 ± 8.2^a , 45.0 ± 17.1^b , $33.0 \pm 14.2^{a,b}$, 5.8 ± 2.3^c , 34.9 ± 17.8^a or 6.1 ± 2.2^c , in control, Cer, GdCl₃ + Cer, Vin + GdCl₃ + Cer, FK506 + Cer or Vin + FK506 + Cer, respectively; non coincident superscripts letters: $p < 0.05$). Leukocyte accumulation in the pancreas was investigated by measuring MPO activity (4 h after the first injection of Cer). In Fig. 3 it can be seen that pre-treatment with vinblastine sulfate resulted in blunted pancreatic MPO levels, pointing to an in situ depletion of neutrophil infiltration, as described elsewhere (Sarmiento et al., 2008). These changes in MPO activity correlate with histological analysis showing a significant lower amount of leukocytes, and particularly of neutrophils, in the pancreas from rats pre-treated with vinblastine sulfate (i.e. $220^a \pm 9$, $227^a \pm 7$ or $52^b \pm 5$, in Cer, GdCl₃ + Cer or Vin + GdCl₃, respectively; non coincident superscripts letters: $p < 0.05$; counting as indicated

in Section 2) (Supplementary Fig. S2). Regarding serum amylase levels, the rats pretreated with vinblastine sulfate and then treated with GdCl₃ were the only animals in which the amylase showed a significant reduction in activity with respect to the rats given Cer alone (909 ± 64^a , $29,421 \pm 5698^b$, $29,397 \pm 7875^b$, $17,553 \pm 2020^c$, $23,643 \pm 5456^b$ or $22,587 \pm 6397^b$, in control, Cer, GdCl₃ + Cer, Vin + GdCl₃ + Cer, FK506 + Cer or Vin + FK506 + Cer, respectively; non coincident superscripts letters: $p < 0.05$). Our results differ from other reported results showing a reduction in serum amylase activity due to GdCl₃ itself (Pastor et al., 2006), but are coincident with our previously reported data (García-Hernández et al., 2014). Fig. 4 shows that GdCl₃ alone was able to reverse the increase in LIMP-2 protein expression due to Cer treatment, and in Supplementary Fig. S3 it is shown that GdCl₃ did not change LIMP-2 protein level in normal controls with no AP. Nevertheless, the depletion of neutrophils in the animals (rats pretreated with vinblastine sulfate) abolished such a reversion during the intermediate phase of Cer-induced AP. Also, FK506 alone did not significantly affect the changes in LIMP-2 expression after Cer treatment, and vinblastine sulfate pretreatment did not modify such FK506 behavior. Since vinblastine sulfate alone might increase LIMP-2 level for days before AP was induced, we also examined LIMP-2

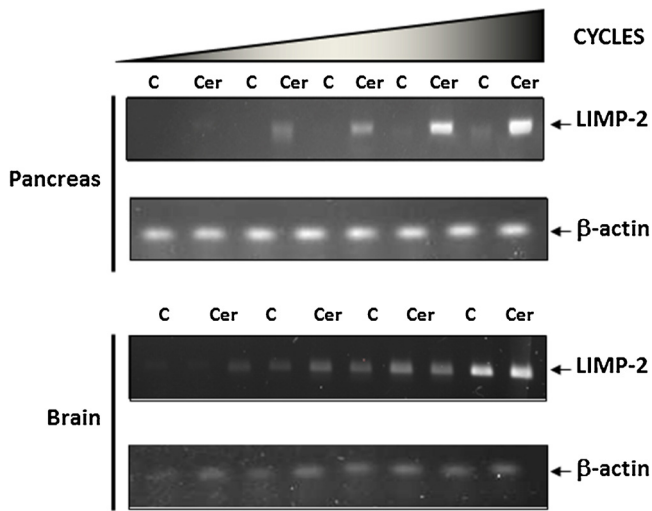


Fig. 2. LIMP-2 mRNA expression in the early phase of Cer-induced AP. Rats were either administered saline (0.9% NaCl) (control, C) or treated with Cer (P), as indicated in Section 2, and then killed 2 h after the first injection of Cer. mRNA expression was analyzed in pancreas or brain by RT-PCR. β -actin was used as a loading control. A representative RT-PCR is shown. Experiments were repeated in four different animals with similar results.

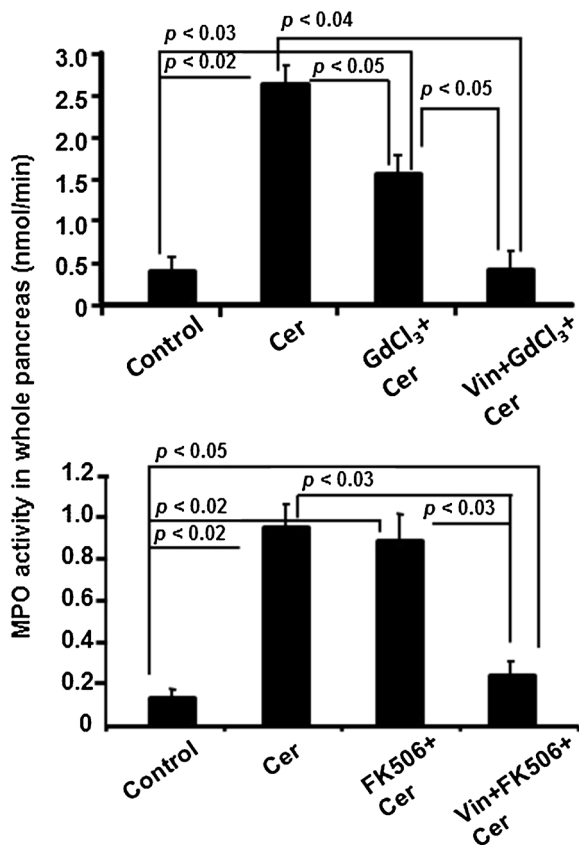


Fig. 3. Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on pancreatic MPO levels in the intermediate phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with GdCl₃, FK506 or their vehicles (0.9% NaCl) as indicated in Section 2. The animals were subsequently injected subcutaneously four times with either Cer or its vehicle [20 mg/kg or saline (0.9% NaCl) at hourly intervals, respectively]. One group of rats (Vin) were given 0.75 mg/kg i.v. vinblastine sulfate to induce neutropenia before pretreatments with GdCl₃ or FK506, as indicated in Section 2. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

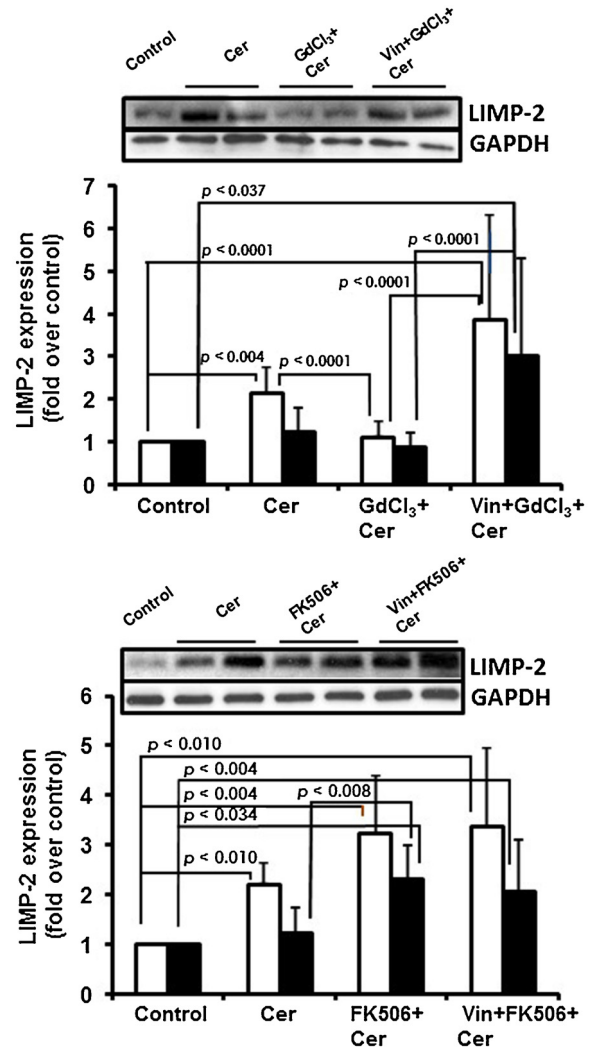


Fig. 4. Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on LIMP-2 protein expression in the intermediate phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with vinblastine sulfate, GdCl₃, FK506 or their vehicles (0.9% NaCl) as indicated in Fig. 3. Quantification (graphics, values given as LIMP-2/GAPDH) of expression (Western blots in whole post-nuclear pancreatic homogenates – a representative is shown – where the 2 animals of each group are representative of the higher and lower levels of the standard deviation of the experiment) was carried out per mg of protein (■) and considering the whole pancreas (□). Each lane in the blots contained 25 μ g of proteins. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

protein expression in controls pre-treated with vinblastine sulfate but with no AP. Supplementary Fig. S4 shows that neutrophil infiltration alone was not the main cause of the LIMP-2 protein increase in Cer-induced AP, because the latter did not change in rats pretreated or not with vinblastine sulfate. Regarding other lysosomal membrane proteins, the different interventions did not change the large decrease in LAMP-2 protein expression detected during the intermediate phase of AP (Supplementary Fig. S5).

Supplementary Figs. S2–S5 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.01.010>.

To examine the cellular source of LIMP-2 following Cer or the white blood cell inhibitor administrations, we performed immunohistochemical studies (Fig. 5). Immunoreactivity was observed in the acinar cells (mainly in the basal region). In both control animals and in rats treated with GdCl₃ + Cer, a faint immunoreactivity was observed. However, this immunoreactivity was stronger in

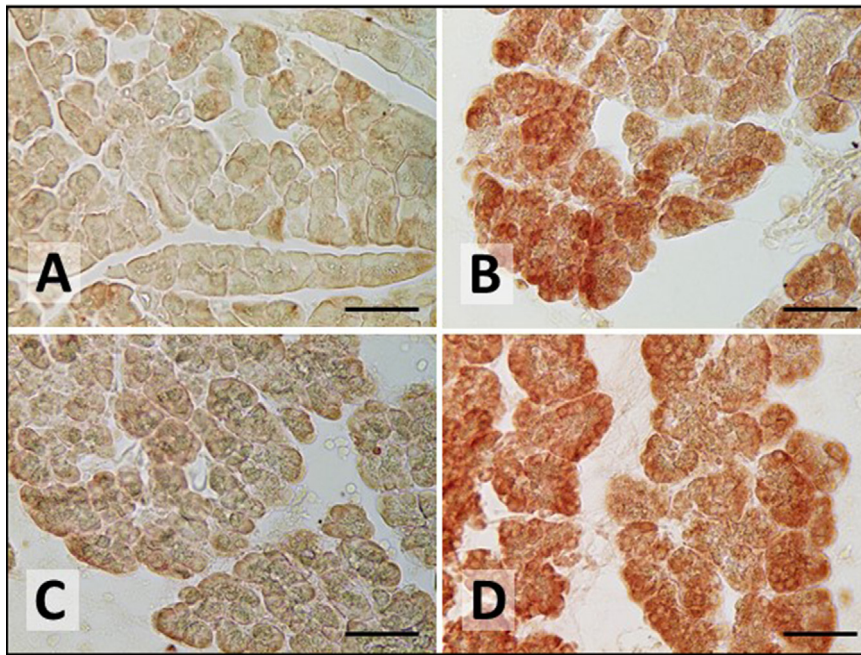


Fig. 5. Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on LIMP-2 immunostaining in the intermediate phase of Cer-induced AP. Groups of rats: control (A), cerulein (B), $GdCl_3$ + cerulein (C) or vinblastine + $GdCl_3$ + cerulein (D). Rats were pretreated with $GdCl_3$ (photomicrographs C and D) or their vehicles (photomicrographs A and B) as indicated in Section 2. The animals were subsequently injected subcutaneously four times with either Cer (photomicrographs B, C and D) or its vehicle (photomicrograph A) at hourly intervals, respectively. One group of rats (D) was given vinblastine sulfate to induce neutropenia before pretreatments with $GdCl_3$, as indicated in Section 2. Note that the immunoreactivity is stronger in the animal treated with cerulein (B) or vinblastine + $GdCl_3$ + cerulein (D) than in the animal treated with $GdCl_3$ + cerulein (C). Scale bar: 50 mm.

the Vin + $GdCl_3$ + Cer group of rats. This result correlates with the immunoblotting results.

3.3. Effect of MAPKs inhibitors and rolipram on LIMP-2 expression

Fig. 6 illustrates the effect of two different MAPKs inhibitors – SP600125 and PD98059 – and rolipram, an inhibitor of type IV phosphodiesterase, on the expression levels of LIMP-2 during the early phase of Cer-induced AP. The amelioration of the severity of Cer-induced AP after inhibition of JNK and ERK $\frac{1}{2}$ kinases or after increasing cAMP levels in neutrophils strongly supports the notion of MAPK and cAMP signaling pathways playing essential roles in the pathogenesis of AP (Minutoli et al., 2004; Sato et al., 2006). Previously, we have reported that under the same conditions used here, Cer administration led to an increase in the activation of both ERK $\frac{1}{2}$ and JNK, but not of p38 MAPKs, and that in vivo, the SP600125 and PD98059 pre-treatments led to reductions of JNK and ERK $\frac{1}{2}$ activation, respectively, not affecting the phosphorylation of p38 (García-Hernández et al., 2014). Also, we have previously described that under the conditions used here, rolipram pre-treatment did not affect the activation of JNK and ERK $\frac{1}{2}$ detected after Cer treatment (García-Hernández et al., 2014). Regarding serum amylase levels, neither SP600125 nor PD98059 significantly reduced the enzyme activity (although SP600125 showed a tendency to reduce it) (data not shown). By contrast, rolipram significantly reduced the serum amylase activity ($14,950 \pm 6900^a$, $24,900 \pm 8050^b$, 1040 ± 29^c , 1100 ± 160^c in Cer + rolipram, Cer + rolipram vehicle, Cer vehicle + rolipram and Cer vehicle + rolipram vehicle, respectively; $p < 0.02$). These data are similar to previously reported results (García-Hernández et al., 2014). Regarding organ edema, coincident with previous results (García-Hernández et al., 2014), the increase in the pancreatic wet weight reflects that the treatments resulted in significant organ edema [0.70 ± 0.07 vs 0.39 ± 0.04 pancreas/body weight (%) in Cer + inhibitor vehicle or Cer vehicle + inhibitor vehicle, respectively, $p < 0.001$]. Cer-induced edema

was partially reduced after SP600125 (70%) or PD98059 (50%) pre-treatments (0.49 ± 0.10 or 0.54 ± 0.11 pancreas/body weight (%) in Cer + SP600125 or Cer + PD98059, respectively). By contrast, opposite to what happened in fully developed Cer-induced AP (Sato et al., 2006), rolipram pre-treatment did not reduce the extent of edema (data not shown) probably because neutrophil infiltration is still low during this early phase (2 h after the first Cer injection). Altogether, our results support the notion of an early protective effect of MAPK inhibition on intrapancreatic damage. In Fig. 6 it can be observed that both SP600125 and PD98059 pre-treatments suppressed the increase in the expression of LIMP-2 after Cer administration. By contrast, such an increase was not modified in the pancreata obtained from Cer-injected rats pre-treated with rolipram. Regarding other lysosomal membrane proteins, the different interventions did not change the decrease in LAMP-2 protein expression detected during the early phase of AP (Supplementary Fig. S6).

Supplementary Fig. S6 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.01.010>.

4. Discussion

It has been proposed that alterations in gene and/or protein expression within the initiation phase of AP play an important role in its development (Ji et al., 2003), transferring the early activated signaling pathways in pancreatic acinar cells towards final responses. It has also been suggested that LIMP-2 plays an important role in mediating the inflammatory response, such as that observed in AP. Based on these features we have shown here that the pancreatic expression of LIMP-2 is increased at both the protein and mRNA level from the early phase of Cer-induced AP. This increase is regulated/modulated by infiltration as well as MAPK inhibition.

Although a neutrophil depletion reduces the severity of AP the protection is not complete, probably due to the presence of local pancreatic macrophages (Pastor et al., 2006). Kupffer cells (resident

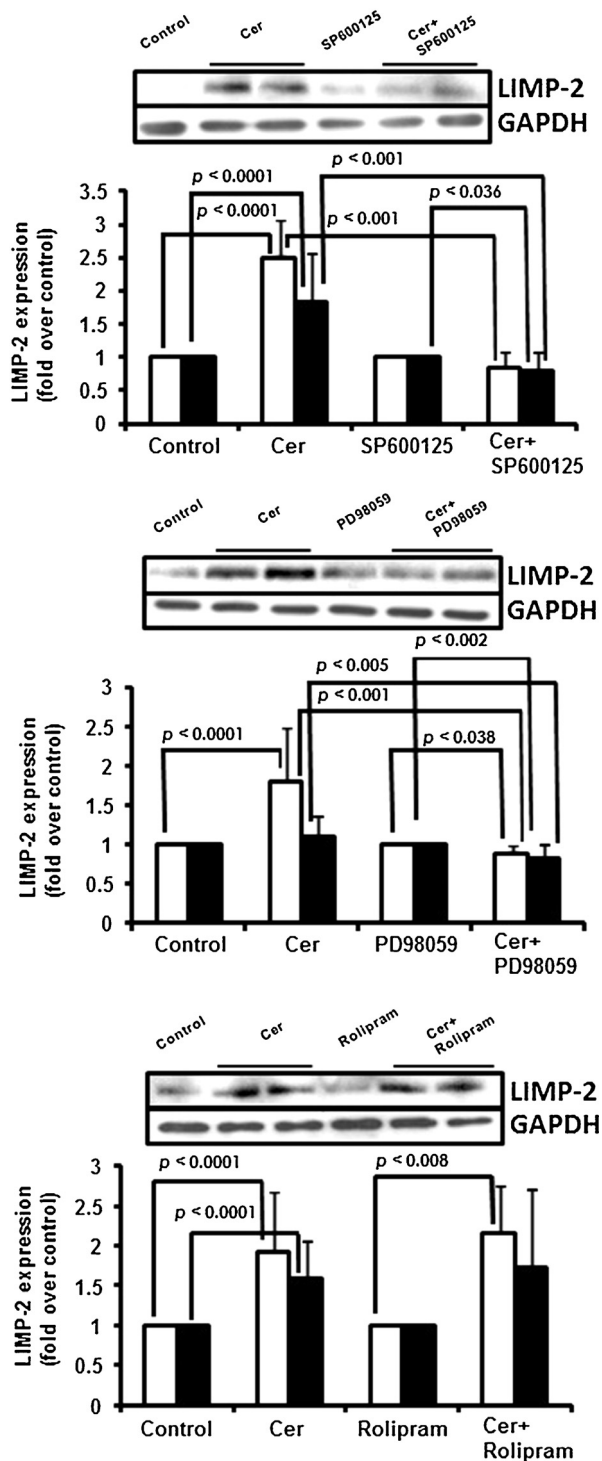


Fig. 6. Effect of MAPKs and PDE4 inhibitor pretreatments on LIMP-2 protein expression in the early phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with SP600125, PD98059, rolipram or its vehicles as indicated in Section 2. Subsequently, the animals were injected subcutaneously twice with either Cer or its vehicle [20 mg/kg or saline (0.9% NaCl, Sal) at hourly intervals, respectively]. Quantification (graphics, values given as LIMP-2/GAPDH ratios, and considering both controls: control and inhibitor alone as 1) of expression (Western blots in whole post-nuclear pancreatic homogenates – a representative is shown – where the 2 animals pretreated with the inhibitors are representative of the higher and lower levels of the standard deviation of the experiment) was carried out per mg of protein (■) and considering the whole pancreas (□). Each lane in the blots contained 25 μ g of protein. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

macrophages in the liver) can be inactivated by $GdCl_3$ (Pastor et al., 2006) at the nontoxic dose used in this work (Gloor et al., 1998; Vonlaufen et al., 2007). Therefore, it is probable that gadolinium may have effects on resident macrophages in the pancreas as well (Vonlaufen et al., 2007). It is assumed that Kupffer cells are the main source of inflammatory cytokines producing systemic injury in AP (Gloor et al., 2000). Also, although to a lower extent than neutrophils, activated lymphocytes, especially T lymphocytes, seem to be enrolled in the development of AP (Vonlaufen et al., 2007). Thus, the $CD4^+$ T helper subset is a mediator of local tissue injury in Cer-induced AP in mice (Demols et al., 2000). FK506 is a drug with no adverse effects on the exocrine pancreas that inhibits calcineurin phosphatase after binding to intracellular immunophilins on T-helper lymphocytes (Dumont, 2000), which is involved in the modulation of the expression of cytokine genes. Nevertheless, the influence of FK506 in AP depends on the animal model used for the induction of pancreatitis, since both attenuation in intrapancreatic damage and no changes at all have been reported (Echigo et al., 1995; Liu et al., 2010; Mayer et al., 2000).

Our results indicate that $GdCl_3$ was able to reverse the increase in the expression of LIMP-2 due to Cer observed in the whole pancreas, which points towards an effect of cytokines produced by the resident macrophages. Intriguingly, such reversion needed the presence of neutrophils because the neutrophil depletion, due to vinblastine administration, abolished $GdCl_3$ action, while having no effect on LIMP-2 expression in the pancreas from animals without pancreatitis (Supplementary Fig. S3). Taken together, the data seem to support a type of crosstalk between macrophages and neutrophil infiltration, in which the amount of infiltrated cells could play a role, that will need to be addressed in the future. In this sense, it is known that tumor necrosis factor (TNF) and other cytokines produced by neutrophils induce macrophage differentiation and activation (Nathan, 2006). With respect to FK506, lymphocytes blockage (FK506 + Cer group) or a neutropenic state (Vin + FK506 + Cer group) did not change the increase in the expression of LIMP-2 due to Cer in the whole pancreas. The latter is in accordance with the macrophage–neutrophil pair playing a role in the increase in LIMP-2 expression due to Cer observed in the whole pancreas, as indicated above.

One of the relevant issues during the early phase (first 1–1.5 h) of AP is the activation of JNK and $ERK\frac{1}{2}$ (Clemons et al., 2002; Hofken et al., 2000; Minutoli et al., 2004), not only because of their role in phosphorylation signaling, but also because these stress kinases may regulate transcription factors (TFs) induced early on during the onset of AP (Ji et al., 2003), as well as protein translation (Williams, 2001). Regarding this, we have previously reported an increase in particular protein tyrosine phosphatases in the pancreas at the level of both protein and mRNA as an early event during the development of Cer-induced AP (Sarmiento et al., 2008, 2010). Such an increase was modulated by the $ERK\frac{1}{2}$ and/or JNK kinases, cAMP levels, and general neutrophil infiltration of the pancreas (García-Hernández et al., 2014). To analyze the implication of the stress kinases in the early increase of LIMP-2 protein expression in Cer-induced AP, here we used the stress kinase inhibitors SP600125, a JNK inhibitor, and PD98059, an $ERK\frac{1}{2}$ inhibitor. Under the conditions used in this study, we have previously demonstrated that the two inhibitors, rather than elicit mixed inhibitions of both MAPKs (Minutoli et al., 2004), remained specific to one type of MAPK (Reczek et al., 2007). In addition, we also analyzed the effect of rolipram, a specific strong inhibitor of type IV phosphodiesterase that under the conditions used in this work did not affect the MAPK activation state (García-Hernández et al., 2014). These results have allowed us to conclude that in the early phase of Cer-induced AP both JNK and $ERK\frac{1}{2}$ seems to play a coordinated role in the increase in LIMP-2 protein expression due to Cer, because such an effect was equally blunted after SP600125 or PD98059 pre-treatments. This

role of JNK is also interesting because we have previously reported that STRAP, an inhibitor of transforming growth factor β (TGF- β), that acts as a negative regulator of the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-1)-mediated JNK signaling cascade, is overexpressed during the early phase of Cer-induced AP (García-Hernández et al., 2012). The experiments with rolipram were done for comparison and as an internal quality control of our results. It is known that MAPKs (Minutoli et al., 2004) and the increases in intracellular cAMP levels (Semmler et al., 1993) either up-regulate or reduce the expression of inflammatory cytokines, such as TNF- α that prime cell infiltration in the pancreas, respectively. The lack of an effect of rolipram in the increase in LIMP-2 expression due to Cer is in agreement with the implication of the infiltration in such an increase, because it is known that the increase in cAMP reduces general infiltration (Semmler et al., 1993), and rolipram suppresses the neutrophil infiltration in the pancreas due to Cer (Satoh et al., 2000). Since type IV phosphodiesterase is abundantly expressed in neutrophils, rolipram will target at least neutrophils, probably exerting anti-inflammatory effects through the inhibition of diverse leukocyte functions such as the production/secretion of proinflammatory cytokines.

Concerning serum amylase activity, our data here and those reported previously by us (Sarmiento et al., 2008, 2010) support the notion that its reduction after MAPK inhibition would not occur during the early phase of AP but later in its development (Minutoli et al., 2004; Sarmiento et al., 2008, 2010). FK506 alone did not decrease serum amylase activity during the early phase of AP as reported here and before (García-Hernández et al., 2014), neither in fully developed Cer-induced AP (Rau et al., 2006). GdCl₃ neither reduced serum amylase activity during the early phase of AP (this work; García-Hernández et al., 2014), but it seems to be reduced in fully developed Cer-induced AP in mice (Pastor et al., 2006). Accordingly, the prevention of Kupffer cell activation by GdCl₃ would render a reduction in amylase activity later in the development of AP. Our results support the notion of the existence of macrophages in the pancreas, because: (i) GdCl₃ (that is specifically taken up by Kupffer cells (Pastor et al., 2006)) alone reduced MPO activity, and such activity was completely reduced to the control level when GdCl₃ treatment was associated with a neutropenic state; (ii) FK506 treatment also associated to a neutropenic state reduced MPO activity almost completely. These results are similar to those previously reported by us (García-Hernández et al., 2014).

With respect to the inflammatory process in AP, it is important to note that previous reports suggested that the deficiency in the lysosomal LAMP-1 and LAMP-2 proteins, due to a malfunctioning of cathepsins, leads to impaired autophagy, inflammation and acinar cell necrosis in pancreatitis (Gukovsky et al., 2012). Here we show that some of the interventions that reverse the up-regulation of LIMP-2, such as MAPK inhibition, protect against intrapancreatic damage, even though they have no effect on serum amylase levels, as indicated by their effect on edema. By contrast, rolipram did not reverse the up-regulation of LIMP-2, and neither did it reduce intrapancreatic edema, although did reduce amylase levels. GdCl₃ alone, which reversed the up-regulation of LIMP-2, did not have any effect on serum amylase at 4 h after Cer injection (this work), but decreased amylase levels in fully developed AP (Pastor et al., 2006).

In summary, in this study we have detected an increase in LIMP-2 in the pancreas at the level of both protein and mRNA as an early event during the development of Cer-induced AP. The cellular source of LIMP-2 was mainly acinar cells. The use of inhibitors of the infiltration process supports the implication of macrophages modulated by neutrophils in the regulation of such increase. And lastly, the stress kinases JNK and ERK1/2 seem to play a coordinated role in the increase in LIMP-2 protein expression due to Cer. Our

results prompt us to continue investigating the potential role of LIMP-2 in the inflammation process associated with AP.

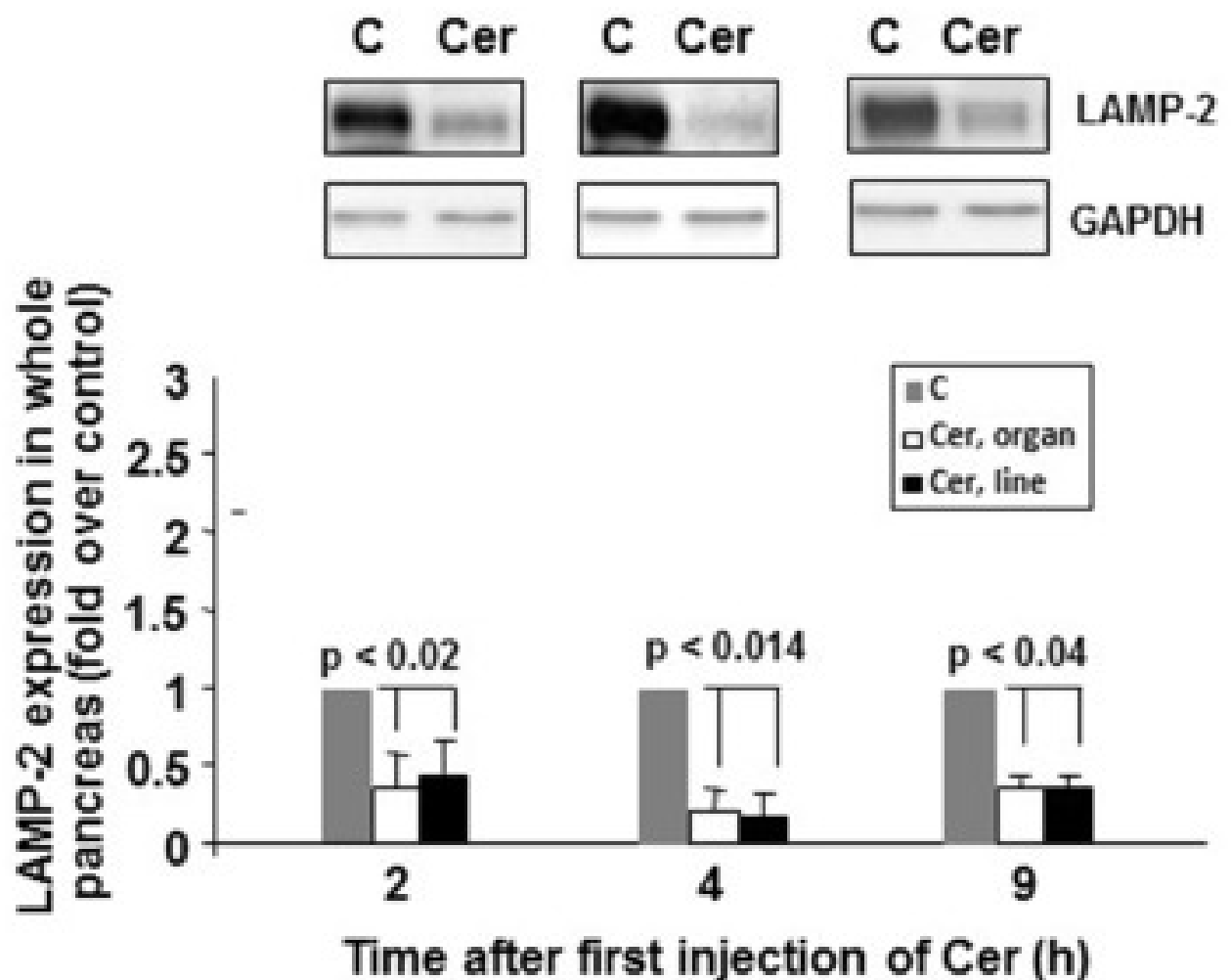
Acknowledgements

This work has been supported in part by Instituto de Salud Carlos III/FEDER (PI15/01156) and Universidad de Salamanca (18KAFG/463AC01), Spain. V. García-Hernández was a recipient of a Spanish predoctoral fellowship from MEC. The authors wish to thank Dr. Jesús Hueso (Hospital Fundación Santísima Trinidad de Salamanca) for his help with the amylase determinations. The β -actin primers were kindly provided by Dr. Serrano (University of Salamanca).

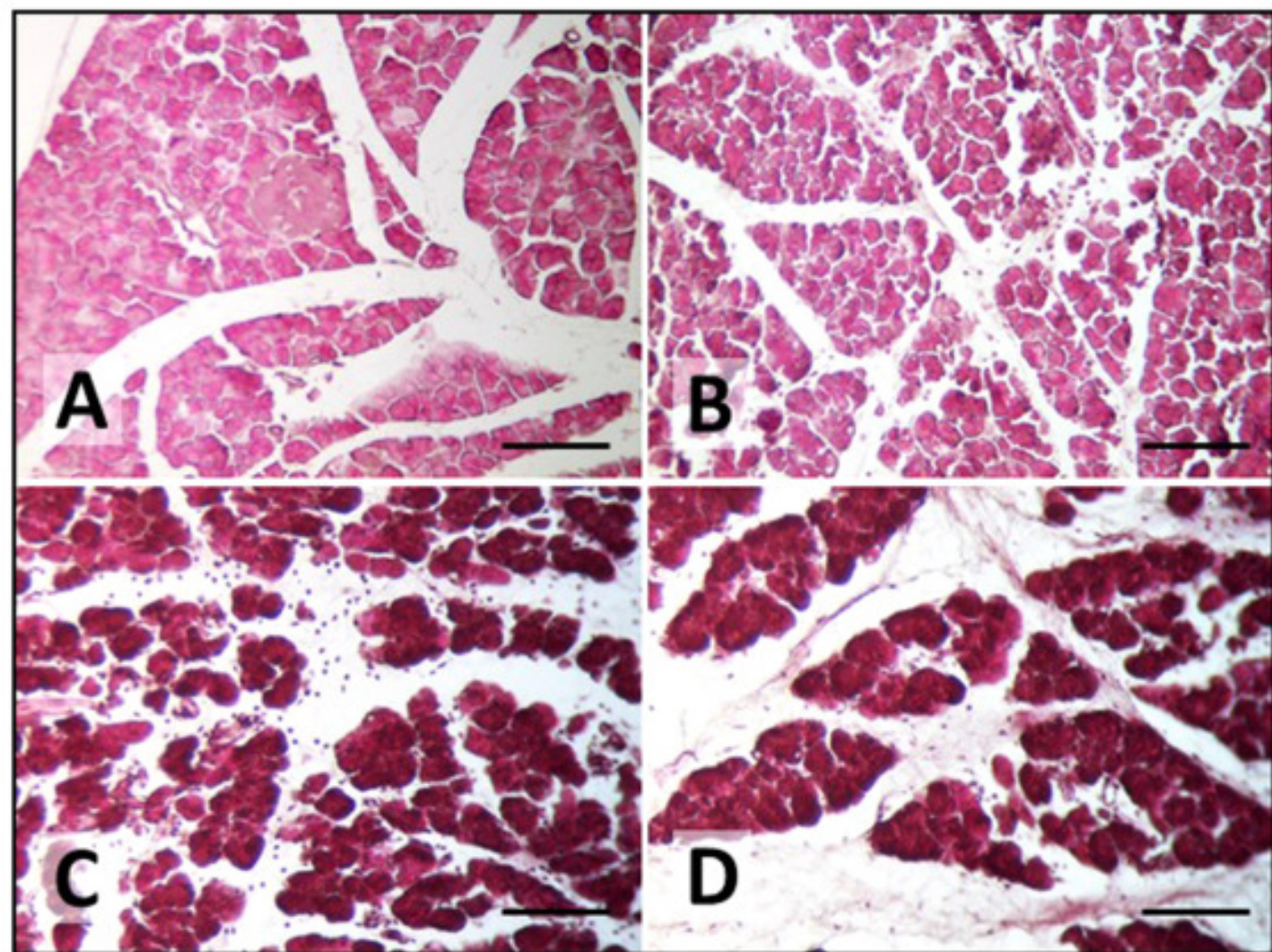
References

- Alonso, R., Montero, A., Arévalo, M., García, L.J., Sánchez-Vicente, C., Rodríguez-Nodal, F., et al., 1994. Platelet-activating factor mediates pancreatic function derangement in cerulein-induced pancreatitis in rats. *Clin. Sci.* 87, 85–90.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Clemons, A.P., Holstein, D.M., Galli, A., Saunders, C., 2002. Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059. *Pancreas* 25, 251–259.
- Demols, A., La Moine, O., Desalle, F., Quertinmont, E., Van Laethem, J.L., Devière, J., 2000. DC4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 118, 582–590.
- Desmond, M.J., Lee, D., Fraser, S.A., Katerelos, M., Gleich, K., Martinello, P., et al., 2011. Tubular proteinuria in mice and humans lacking the intrinsic lysosomal protein SCARB2/Limp-2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 300, F1437–F1447.
- Dumont, F.J., 2000. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr. Med. Chem.* 7, 731–748.
- Echigo, Y., Inoue, K., Kogire, M., Doi, R., Higashide, S., Sumi, S., et al., 1995. Effects of cyclosporine and tacrolimus (FK 506) on acute pancreatitis in mice. *Arch. Surg.* 130, 64–68.
- Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himeno, M., Kato, K., 1991. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 442–452.
- García, M., Barbáchano, E.H., Lorenzo, P.H., San Román, J.I., López, M.A., Coveñas, R., Calvo, J.J., 2009. Saline infusion through the pancreatic duct leads to changes in calcium homeostasis similar to those observed in acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 54, 300–308.
- García-Hernández, V., Sánchez-Bernal, C., Sarmiento, N., Viana, R.A., Ferreira, L., Pérez, N., et al., 2012. Proteomic analysis of the soluble and the lysosomal + mitochondrial fractions from rat pancreas: implications for cerulein-induced acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 1058–1067.
- García-Hernández, V., Sarmiento, N., Sánchez-Bernal, C., Matellán, L., Calvo, J.J., Sánchez-Yagüe, J., 2014. Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 192–201.
- Gloor, B., Todd, K.E., Lane, J.S., Lewis, M.P., Reber, H.A., 1998. Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J. Gastrointest. Surg.* 2, 430–435.
- Gloor, B., Blinman, T.A., Rigberg, D.A., Todd, K.E., Lane, J.S., Hines, O.J., et al., 2000. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 21, 414–420.
- Gukovsky, I., Pandolf, S.J., Mareninova, O.A., Shalbuva, N., Jia, W., Gukovskaya, A.S., 2012. Impaired autophagy and organellar dysfunction in pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27, 27–32.
- Hernández-Hernández, A., Rodríguez, M.C., López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J.I., Shnyrov, V., Llanillo, M., et al., 2006. Alterations in erythrocyte membrane protein composition in advanced non-small cell lung cancer. *Blood Cells. Mol. Dis.* 1419, 355–363.
- Hofken, T., Keller, N., Fleischer, F., Goke, B., Wagner, A.C., 2000. Map kinase phosphatases (MKP's) are early responsive genes during induction of cerulein hyperstimulation pancreatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 680–685.
- Ji, B., Chen, X., Misek, D.E., Kuick, R., Hanash, S., Ernst, S., et al., 2003. Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. *Physiol. Genomics* 14, 59–72.
- Kuronita, T., Eskelinen, E.-L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M., Tanaka, Y., 2002. A role for the lysosomal membrane protein LAMP2 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J. Cell Sci.* 115, 4117–4131.
- Lee, D.H., Gan, P.Y., Katerelos, M., Fraser, S.A., Gleich, K., Holdsworth, S.R., et al., 2014. Absence of the lysosomal protein Limp-2 attenuates renal injury in crescentic glomerulonephritis. *Immunol. Cell Biol.* 92, 400–408.
- Liu, C., Dou, K., Dou, C., Liu, J., Zhao, Q., 2010. Anti-inflammatory effects of tacrolimus in a rat model of acute pancreatitis. *Med. Chem.* 6, 37–43.

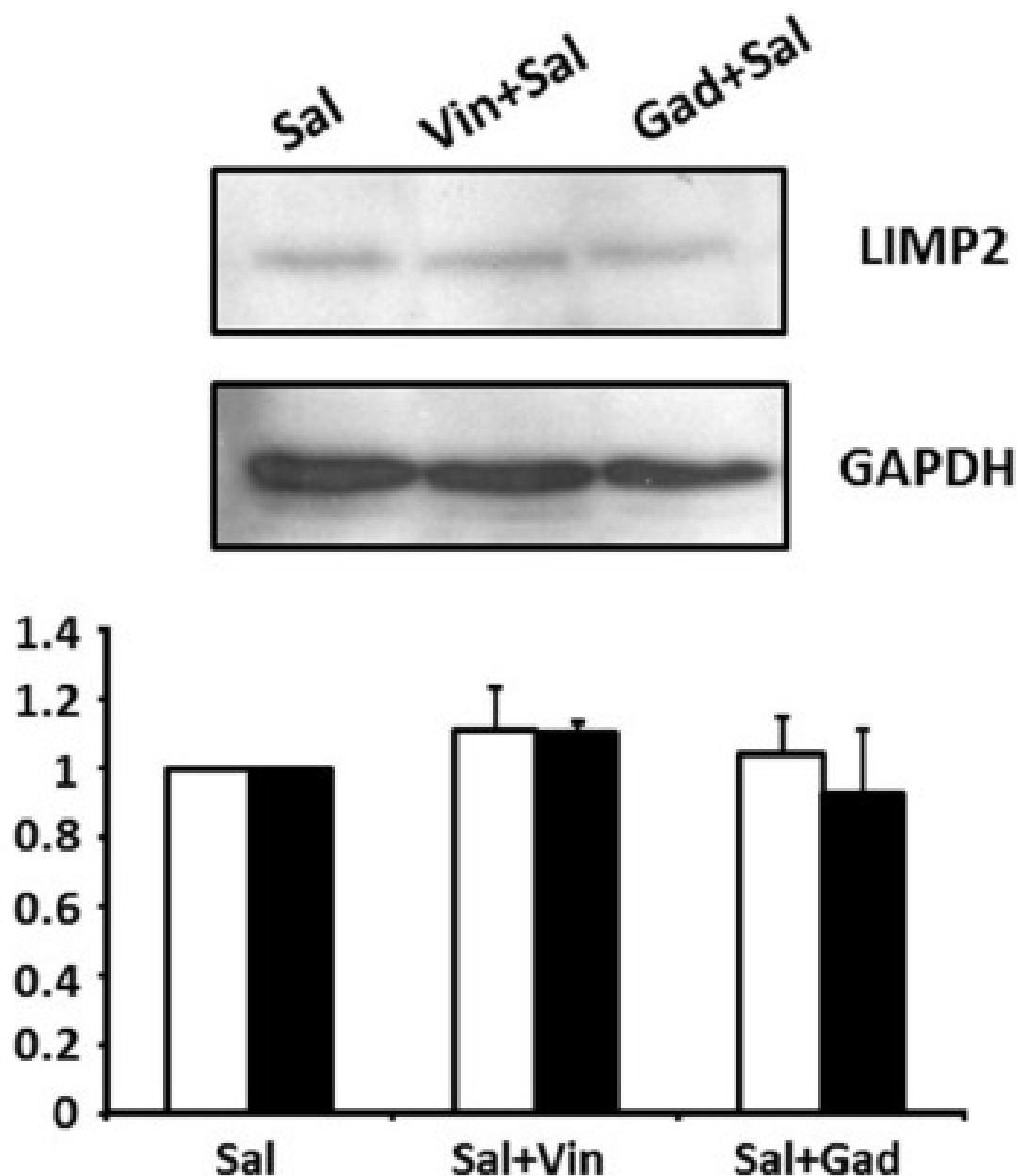
- Mayer, J.M., Laine, V.J., Gezgin, A., Kolodziej, S., Nevalainen, T.J., Storck, M., et al., 2000. Single doses of FK506 and OKT3 reduce severity in early experimental acute pancreatitis. *Eur. J. Surg.* 9, 734–741.
- Mayerle, J., Schnekenburger, J., Kruger, B., Kellermann, J., Ruthenburger, M., Weiss, F.U., et al., 2005. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 129, 1251–1267.
- Minutoli, L., Altavilla, D., Marini, H., Passaniti, M., Bitto, A., Seminara, P., et al., 2004. Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis. *Life Sci.* 75, 2853–2866.
- Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.
- Pastor, C.M., Vonlaufen, A., Georgi, F., Hadengue, A., Morel, P., Frossard, J.-L., 2006. Neutrophil depletion-but not prevention of Kupffer cell activation-decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 28, 1219–1224.
- Pescador, R., Manso, M.A., Revollo, A.J., De Dios, I., 1995. Effect of chronic administration of hydrocortisone on the induction and evolution of acute pancreatitis induced by cerulein. *Pancreas* 11, 165–172.
- Rau, B.M., Krüger, M.C., Hasel, C., Oliveira, V., Rubie, C., Beger, H.G., Schilling, M.K., 2006. Effects of immunosuppressive and immunostimulative treatment on pancreatic injury and mortality in severe acute experimental pancreatitis. *Pancreas* 33, 174–182.
- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., et al., 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of β -glucocerebrosidase. *Cell* 131, 770–783.
- Saluja, A.K., Bhagat, L., Lee, H.S., Bhatia, M., Frossard, J.L., Steer, M.L., 1999. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G835–G842.
- Sarmiento, N., Sánchez-Bernal, C., Ayra, M., Pérez, N., Hernández-Hernández, A., Calvo, J.J., et al., 2008. Changes in the expression and dynamics of SHP-1 and SHP-2 during cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 271–279.
- Sarmiento, N., Sánchez-Bernal, M.C., Pérez-González, M.N., Mangas, A., Sardina, J.L., Calvo, J.J., et al., 2010. Rolipram and SP600125 suppress the early increase in PTP1B expression during cerulein-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* 39, 639–645.
- Sarmiento, N., Sánchez-Yagüe, J., Juanes, P.P., Pérez, N., Ferreira, L., García-Hernández, V., et al., 2011. Changes in the morphology and lability of lysosomal subpopulations in caerulein-induced acute pancreatitis. *Dig. Liver Dis.* 43, 132–138.
- Sato, T., Otaka, M., Odashima, M., Kato, S., Jin, M., Konishi, N., et al., 2006. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 339–344.
- Satoh, A., Shimosegawa, T., Satoh, K., Ito, H., Kohno, Y., Masamune, A., et al., 2000. Activation of A1-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats. *Gastroenterology* 119, 829–836.
- Schroen, B., Leenders, J.J., van Erk, A., Bertrand, A.T., van Loon, M., van Leeuwen, R.E., et al., 2007. Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *J. Exp. Med.* 204, 1227–1235.
- Semmler, J., Wachtel, H., Endres, S., 1993. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses tumor necrosis factor- α production by human mononuclear cells. *Int. J. Immunopharmacol.* 15, 409–413.
- Sendler, M., Dummer, A., Weiss, F.U., Krüger, B., Wartmann, T., Scharffetter-Kochanek, K., et al., 2013. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut* 62, 430–439.
- Vonlaufen, A., Apte, M.V., Imhof, B.A., Frossard, J.L., 2007. The role of inflammatory and parenchymal cells in acute pancreatitis. *J. Pathol.* 213, 239–248.
- Williams, J.A., 2001. Intracellular signalling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 77–97.
- Yamayoshi, S., Iizuka, S., Yamashita, T., Minagawa, H., Mizuta, K., Okamoto, M., et al., 2012. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J. Virol.* 86, 5686–5696.
- Yönetçi, N., Oruç, N., Özütemiz, A.O., Celik, H.A., Yüce, G., 2001. Effects of mast-cell stabilization in caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Int. J. Pancreatol.* 29, 163–171.
- Zhao, M., Xue, D.B., Zheng, B., Zhang, W.H., Pan, S.H., Sun, B., 2007. Induction of apoptosis by artemisin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 14, 5612–5617.



Supplementary Fig S1. Expression of LAMP-2 during the development of Cer-induced AP. Rats were either administered saline (0.9% NaCl) (control, C) or treated with Cer, as indicated in Materials and methods, and then killed 2, 4 or 9 h after the first injection of Cer. Quantification (graphic, values given as LAMP-2/GAPDH ratios, and considering control as 1) of expression (Western blots in whole post nuclear pancreatic homogenates where one representative for each time-point is shown) was carried out per mg of protein (■) and considering the whole pancreas (□). Data are means S.D. of 6 animals.



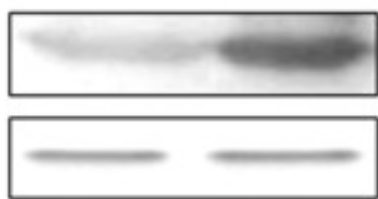
Supplementary Fig. S2. Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on pancreatic infiltration in the intermediate phase of Cer-induced AP. Light microscopy of the rat pancreas stained with H&E in control (A), cerulein (B), GdCl₃ + cerulein (C) or vinblastine + GdCl₃ + cerulein groups of rats. Rats were pretreated with GdCl₃ (photomicrographs C and D) or their vehicles (photomicrographs A and B) as indicated in the Materials and methods section. The animals were subsequently injected subcutaneously four times with either Cer (photomicrographs B, C and D) or its vehicle (photomicrograph A) at hourly intervals, respectively. One group of rats (D) was given vinblastine sulfate to induce neutropenia before pretreatments with GdCl₃, as indicated in the Materials and methods section. Observe a higher leukocyte infiltration in the animal treated with GdCl₃ + cerulein (C) than in the animal treated with vinblastine + GdCl₃ + cerulein (D). Scale bar: 100 μm.



Supplementary Fig S3. Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on LIMP-2 protein expression in rats without pancreatitis. Rats were pretreated with vinblastine sulfate, $GdCl_3$ or or their vehicles (0.9% NaCl) as indicated in Materials and methods. Quantification (graphics, values given as LIMP-2/GAPDH) of expression (Western blots in whole post nuclear pancreatic homogenates — a representative is shown) was carried out per mg of protein (■) and considering the whole pancreas (□). Each lane in the blots contained 25 mg of proteins. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

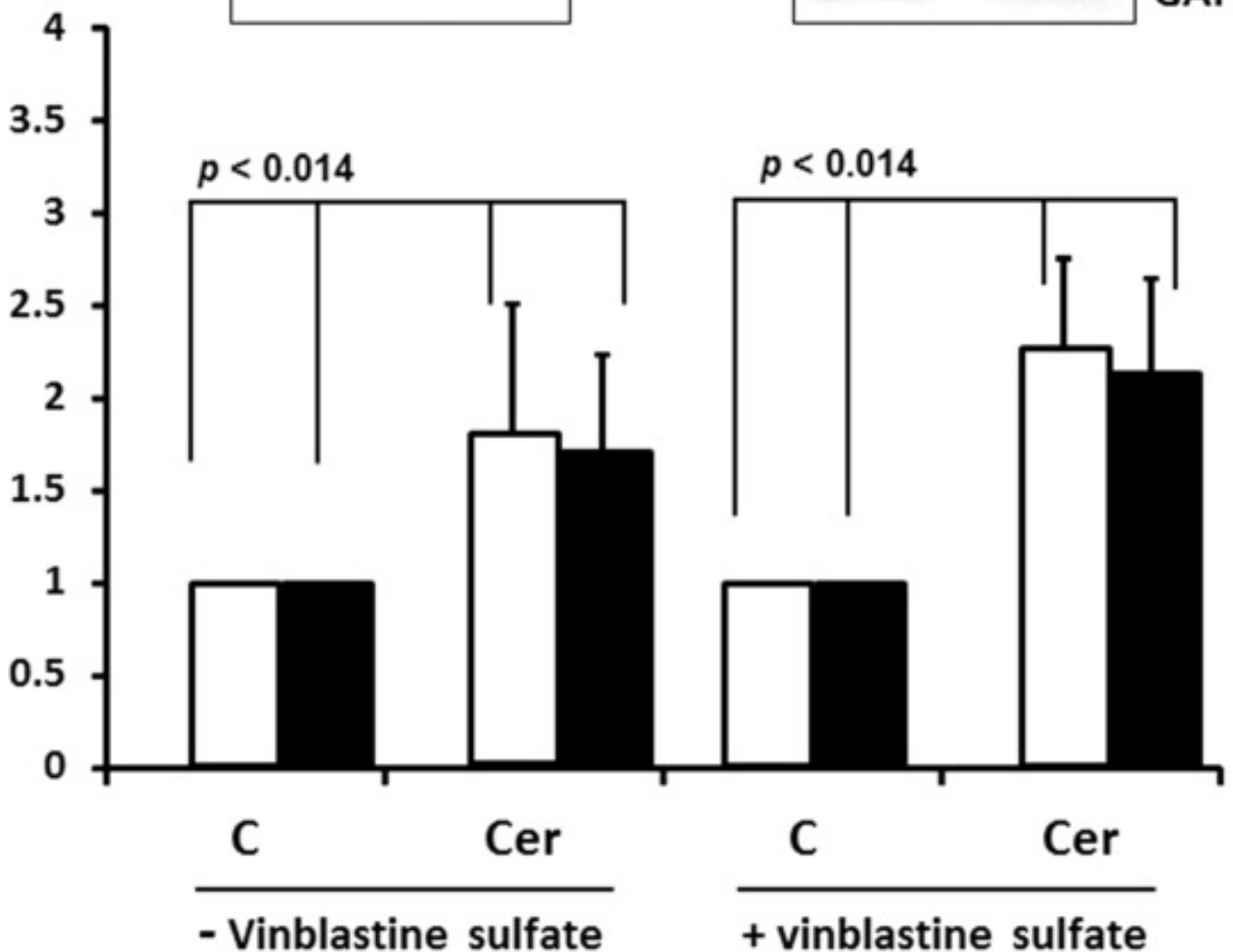
- Vinblastine sulfate

+ vinblastine sulfate

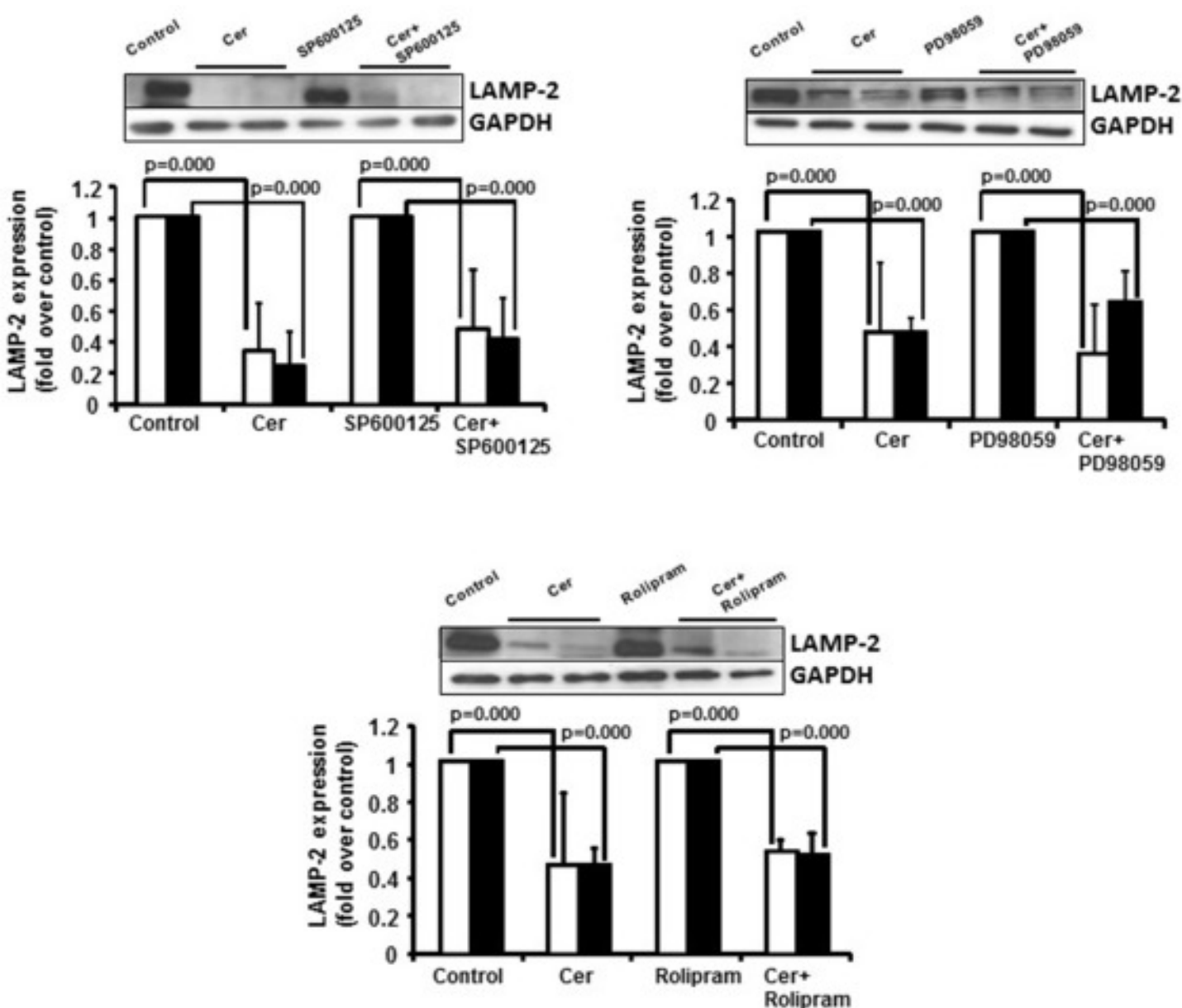


LIMP-2

GAPDH



Supplementary Fig S4. Effect of neutropenia on LIMP-2 protein expression during the development of Cer-induced AP. Rats were given 0.75 mg/kg i.v. vinblastine sulfate to induce neutropenia. Four days after vinblastine administration, these neutropenic rats were given 4 injections of saline (0.9% NaCl) or Cer hourly over 4 hours (representing the intermediate phase of AP) as indicated in Materials and methods. The same treatments were given to control animals (C) (saline instead of vinblastine pre-treatment on day 1). Quantification (graphics, values given as LIMP-2/GAPDH) of expression (Western blots in whole post nuclear pancreatic homogenates — a representative is shown) was carried out per mg of protein (■) and considering the whole pancreas (□). Each lane in the blots contained 25 mg of proteins. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.



Supplementary Fig. S6. Effect of MAPKs and PDE4 inhibitor pretreatments on LAMP-2 protein expression in the early phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with SP600125, PD98059, rolipram or its vehicles as indicated in the Materials and methods section. Subsequently, the animals were injected subcutaneously twice with either Cer or its vehicle [20 mg/kg or saline (0.9% NaCl, Sal) at hourly intervals, respectively]. Quantification (graphics, values given as LAMP-2/GAPDH ratios, and considering both controls: Control and inhibitor alone as 1) of expression (western blots in whole post nuclear pancreatic homogenates — a representative is shown — where the 2 animals pretreated with the inhibitors are representative of the higher and lower levels of the standard deviation of the experiment) was carried out per mg of protein (■) and considering the whole pancreas (□). Each lane in the blots contained 25 mg of protein. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment

3.

Objetivo 3:

Determinar por aproximaciones proteómicas de análisis masivo las proteínas solubles y asociadas a membrana cuyos niveles de expresión varíen durante la fase temprana de la PA mediada por Cer.

A Tandem Mass Tag (TMT) proteomic analysis during the early phase of experimental pancreatitis reveals new insights in the disease pathogenesis

Violeta García-Hernández^{†,‡}, Carmen Sánchez-Bernal^{†,‡}, Domitille Schwartz[§],
José J. Calvo^{||,‡}, Jean-Charles Sánchez[§], Jesús Sánchez-Yagüe^{*, †,‡}

[†] Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca,
Salamanca 37007, Spain

[‡] Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca 37007,
Spain

[§] Translational Biomarker Group, Department of Human Protein Sciences,
University Medical Center, 1211 Geneva, Switzerland

^{||} Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca,
Salamanca 37007, Spain

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology.
Edificio Departamental. Lab. 102. Plaza Doctores de la Reina s/n. 37007
Salamanca. Spain. E-mail address: sanyaj@usal.es Tel.: +34 923294526; fax:
+34 923294579.

ABSTRACT

Changes in the protein expression occurring within the initiation phase of acute pancreatitis (AP) might be vital in the development of this complex disease. However, the exact mechanisms involved in the onset of AP remain elusive and most of our knowledge about the pathobiology of AP comes from animal models. We performed in a rat pancreatic model a high-throughput shotgun proteomic profiling of the soluble and whole membrane fractions from the pancreas during the early phase of cerulein (Cer)-induced AP. We identified 997 proteins, of which 353 were significantly differentially expressed (22, 256 or 55 in both, the soluble or the membrane fractions, respectively). Gene ontology and KEGG PATHWAY analyses revealed that these proteins were implicated in molecular mechanisms relevant to AP pathogenesis, including vesicle-mediated and protein transport, lysosomal and mitochondrial impairment or proteolysis. Numerous metabolic processes were downregulated apparently to reduce energy consumption, and a remarkable increase in inflammatory and stress responses was also highlighted. The proteomic data were verified by immunoblotting of 11 and 7 different soluble or membrane-associated proteins, either novel (VPS29 and MCTS1) or known players in AP. Also, our first observation of the imbalance of some COP proteins during AP early phase deserves further characterization.

Keywords: acute pancreatitis, cerulein, proteomics, Tandem Mass Tags (TMT), shotgun proteomics

INTRODUCTION

The mild form of acute pancreatitis (AP) accounts for almost 80% of the patients that suffer from AP, and evolves favourably without reaching the systemic inflammation, remote organ injuries and serious morbidity that are seen in severe forms of pancreatitis.¹ It is assumed that digestive protease activation, co-localization of digestive enzyme zymogens and lysosomal hydrolases, alterations in the cytoskeletal organization and inflammatory cell infiltration are important events in the development of pancreatitis.^{2,3} Also, many pathobiological pathways are involved in AP, including inflammation, oedema, microcirculation dysfunction, cellular and oxidative stress responses, apoptosis and necrosis.⁴ Nevertheless, the complexity and interconnexion among all these events and pathways hampers our understanding of the course of the disease and mainly explain why the molecular and signaling mechanisms involved in the initial steps of the disease remains incompletely understood. In this regard, the unmasking of rapid and early events and the activation of primary signaling pathways would be important for the study of AP at the molecular level.⁵ An edematous form of AP can be easily and reproducibly developed in a rat model after cerulein (Cer) injection,⁶⁻⁸ an analogue of cholecystokinin.

The development and application of “omics” techniques are useful to ascertain mechanisms of disease and for the unmasking of potential mechanism-based biomarkers of diseases, including AP.⁹ Regarding AP, 2-DE techniques have focused on the identification of protein changes in model cell systems under culture,^{10,11} in a rodent model of pancreatitis once the disease had fully developed (whole soluble fraction of the pancreas),¹² and done by our group, in the acidic soluble proteins from the soluble and the lysosomal+mitochondrial fractions of rat pancreas during the early phases of Cer-induced AP.¹³ Liquid chromatography-mass spectrometry technique (LC-MS/MS) has been use for the analysis of the low molecular weight proteome in pancreatic tissue soluble extracts in fully

developed AP.¹⁴ Proteomic techniques that use a combination of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D LC-MALDI-M/MS) and isobaric tagging (iTRAQ) have been used for the study of the heat shock-induced protection in AP,¹⁵ and the analysis of the whole soluble pancreatic proteome in necrotizing pancreatitis.¹⁶ Also, the iTRAQ approach has also been used for the analysis of rough endoplasmic reticulum from normal and AP pancreas.¹⁷ ICAT (Isotope Coded Affinity Tags) technology, and MS/MS-bases proteomics have also been used to study total tissue proteins from normal pancreas and chronic pancreatitis or pancreatic adenocarcinoma samples.¹⁸ Nevertheless, considerable efforts are still needed to improve pancreatitis pathogenesis understanding, a prerequisite for the establishment of therapies or the founding of biomarkers of clinical use. We believe that the elucidation of the complex proteome alterations occurring early on in the development of AP may provide AP-specific biological targets for diagnostic biomarkers, disease prevention, and therapeutic strategies.

In the current study, we performed in a rat pancreatitis model a high-throughput quantitative profiling of the soluble and the whole membrane fractions from the pancreas during the early phase of Cer-induced AP compared to controls using a sixplex isobaric chemical labeling technique.¹⁹ We catalogued 997 unique proteins. More than 353 proteins were found to be deregulated in AP vs. control, 312 of them with a significant fold over 1.25. Some of them, including fetuin A, kininogen, different members of the serpin superfamily and coatomers members of the COPI type vesicle may be interesting targets potentially involved early in AP pathogenesis or that might be used as biomarkers.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (weighing 250–280 g) were housed in rooms maintained at 22±1 °C using a 12-h light/dark cycle. Animals were fasted for 24 h before the

experiment but had free access to water. Care was provided in accordance with the procedures outlined in European Community guidelines on ethical animal research (86/609/EEC), and the protocols were approved by the Animal Care Committee of the University of Salamanca.

Induction of AP and preparation of samples

The early phase of AP was induced as described previously.²⁰ Briefly, rats (TMT experiments: 3 AP animals and 3 controls; immunoblotting: 8-11 AP animals and 8-11 controls) received 2 s.c. injections of 20 μg Cer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)/kg body weight or its vehicle (0.9% NaCl), respectively, at hourly intervals. At 2 h after the first injection, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg), blood samples were taken by cardiac puncture and animals were then sacrificed. The pancreata, which were used immediately for experiments, were rapidly dissected out from the surrounding fat tissue and lymph nodes, and their wet weights rapidly measured. A small portion of the tissue was used for histological studies.²¹ The remaining parts of the pancreata were homogenized individually with a Potter Elvehjem device in 4 ml of homogenization buffer (5 mM imidazole buffer, pH 7.4 containing 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin inhibitor, 100 μM TPCK and TLCK, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM NaF and 1 mM Na_3VO_4). Homogenization buffer was then added to reach a ratio of 10 volumes (w/v), mixed well and the total homogenate was centrifuged at 150g for 15 min. The pellet was discarded and the postnuclear homogenate of each pancreas was finally centrifuged at 150,000g for 60 min to obtain the soluble and the whole membrane fractions. The surface of the pellet corresponding to this latter fraction was gently washed once with homogenization buffer with a view to minimize contamination with the soluble fraction. Both fractions were independently used for the proteomic analysis. Serum amylase was measured with a Gernon Star Modular Analyzer, as reported previously.²¹ Protein concentrations were assayed by the method of Bradford²²

using BSA as standard. Special care was taken with this assay in order to minimize deviations in the amount of proteins loaded in each lane of the SDS-PAGE gels. Quality control of the assays was ensured by repeating them at least three times with five different volumes of three-to-five different sample dilutions.

Quantitative simplex tandem mass tags (TMT) analysis

Tandem mass tag-based proteomics were performed as described by Dayon *et al*²³ with slight modifications as indicated below.

Sample preparation and TMT-6 plex labeling

Three control and three pancreatic samples from both the soluble and the whole membrane fractions were randomly selected to perform independent TMT⁶plex experiments. To optimize protein concentration and to assess sample quality, we performed SDS-PAGE and silver staining as described previously.^{24,25} No protein degradation was detected in any of the samples. Fifty μg of proteins from each of the six samples were dried under vacuum, dissolved in 0.1 M TEAB (pH 8.2) containing 0.1% RapiGest SF surfactant (Waters, Milford, USA) and spiked with 0.5 μg of bovine β -lactoglobulin (LACB) as an internal standard for later correction of experimental bias. The protein samples were reduced in 2 mM TCEP (60 min at 60 °C), alkylated in 10 mM IAA (30 min in the dark at RT) and then digested overnight at 37 °C using trypsin, sequence grade (trypsin/protein ratio 1:20). The resulting peptide mixtures were labeled with one of the TMT reagents from the sixplex version (Thermo Scientific, Rockford, IL). Control samples C1, C2, C3 were tagged with TMTs 126.1, 127.1 and 128.1 and AP samples AP1, AP2, AP3 with TMTs 129.1, 130.1 and 131.1, respectively. After 60 min of reaction at rt, 8 μL of hydroxylamine 5 % (w:v) was added to quench the TMT reaction and reverse occasional undesired tagging. After labeling, the six samples from each TMT⁶ experiment were combined and acidified to pH 2.5-3 with 10 μl of trifluoroacetic acid to hydrolyze the RapiGest surfactant (45 min at

37 °C). RapiGest was then removed according to the manufacturer's instructions and the supernatants dried on a SpeedVac.

Off-gel peptide fractionation

The labeled peptide mixtures were desalted using C18 Macro Spin Columns (Harvard Apparatus). Samples were dissolved in 600 μ l of 5 % acetonitrile (ACN), 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and loaded into the columns, reconstituted according to the fabricator's protocol. Finally, peptide samples were eluted with 300 μ l of 50% ACN, 0.1% TFA and dried under vacuum. Peptides were then fractionated by off-gel electrophoresis (OGE) according to their pI on an Agilent 3100 OFFGEL fractionator (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) following the manufacturer's manual. The strip was rehydrated for 30 minutes with 20 μ l of rehydration solution (4.8 % glycerol, 0.6 % IPG buffer pH 3-10 in ultrapure water) per well. The mixtures of labeled peptides were resuspended in 1.2 ml of rehydration solution and 150 μ l of sample solution were loaded per well. Isoelectricfocusing was performed on a commercial 13 cm IPG pH 3–10 linear dry strip (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden) with a 12 wells frame set at 20 °C until 20 kV/h was reached with a maximum current of 50 μ A and power of 200 mW. After focusing, the 12 fractions were recovered individually and their pH values were checked to assess pH gradient efficiency. Finally, the 12 OGE fractions were dried once more, dissolved in 200 μ l of 5 % ACN, 0.1% FA per fraction and cleaned using C18 microspin columns (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Elution was performed with 200 μ l of 50 % ACN, 0.1 % FA per column and eluates were finally evaporated and stored at -20 °C prior MS analysis.

LC-MS/MS analysis

The LC-MS/MS analysis was performed as described elsewhere.²⁶ Each peptidic fraction was reconstituted in 50 μ l of 5 % ACN, 0.1 % TFA. ESI LTQ-OT MS was

performed on a LTQ Orbitrap velos from Thermo Electron (San Jose, CA, USA) equipped with a NanoAcquity system from Waters. Peptides were trapped on a home-made 5 μm 200 \AA Magic C18 AQ (Michrom) 0.1 \times 20 mm pre-column and separated on a home-made 5 μm 100 \AA Magic C18 AQ (Michrom) 0.75 \times 150 mm column. The analytical separation was run for 65 min using a gradient of H₂O/FA 99.9%/0.1% (solvent A) and CH₃CN/FA 99.9%/0.1% (solvent B). For MS survey scans, the OT resolution was set to 60000 and the ion population was set to 5×10^5 with an m/z window from 400 to 2000. Maximum of 3 precursors were selected for both collision-induced dissociation (CID) in the LTQ and high-energy C-trap dissociation (HCD) with analysis in the OT. For MS/MS in the LTQ, the ion population was set to 7E3 for velos while for MS/MS detection in the OT, it was set to 2×10^5 , with resolution of 7500, first mass at m/z = 100, and maximum injection time of 750 ms. The normalized collision energies were set to 35% for CID and 60% for HCD.

Proteomics data analysis

MS/MS data were analysed for protein identifications using EasyProt V2.3²⁷. A total of 12 raw files were obtained. Peak lists were generated into .mgf format with EasyProtConv, and CID/HCD merging was used to improve peptide identification and quantification.²⁸ The resulting 12 .mgf files were merged into a single .mgf file that was searched against UniProt/Swiss-Prot database (UniProtKB release 2014_10 of Oct, 29, 2014), selecting the following parameters: a) *Rattus norvegicus* taxonomy (*Bos Taurus* was used separately to obtain spiked LACB information); b) instrument type was set to ESI-LTQ-Orbitrap with CID_LTQ_scan_LTQ as the scoring model; c) trypsin as the proteolytic enzyme, with one missed cleavage allowed and the normal cleavage mode; d) TMT⁶ amino-terminus, TMT⁶ lysine and cysteine carbamidomethylations as fixed modifications, and oxidation of methionine as variable; e) precursor ion tolerance was set to 10 ppm; f) minimum peptide length was set to 6 amino acids;

g) minimum peptide z-score was set to 4. The technical efficiency of the TMT⁶ experiments was assessed by the peptide labeling rate and the peptide relative intensity distribution of LACB among the 6 tags. Only proteins with at least two unique peptide sequences and a false discovery rate (FDR) $\leq 1\%$ ²⁷ were selected for further quantification. Proteins were clustered based on shared peptides indistinguishable by MS. Quantification was conducted using Isobar R package v.1.9.3.2.²⁹ Isotopic purity correction (according to the manufacturer's algorithm) and Isobar default normalisation were applied for each TMT⁶ reporter ion intensity. For both TMT⁶ experiments, the protein ratio AP/C was computed as 129+130+131 over 126+127+128. Differential protein expression was considered whenever both ratio *p*-value (an estimator of ratio accuracy) and sample *p*-value (an estimator of biological variability and significance) were lower than 0.05.²⁹

Bioinformatics

The soluble and the whole membrane dataset were parsed independently for enrichment analyses. For each fraction dataset, two alternative analysis strategies were adopted. First, a separate enrichment analysis for significant up- or down-regulated proteins was done to determine under or over-represented categories, since it has been reported that this approach is more powerful and representative than analysing all of the differentially expressed (DE) proteins together.³⁰ Furthermore, as is widely done, enrichment analysis of all differentially modulated proteins was undertaken to uncover enriched terms based on a combination of both up- and down-regulated proteins. The differentially expressed proteins (either UP, DOWN or total DE) were parsed through PANTHER online tool v11.1 (www.pantherdb.org)³¹ embedded in the GO web service (geneontology.org/page/go-enrichment-analysis) by GO biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF) annotations, as well as by PANTHER protein class. For each ontology category, fold

enrichment (FE) value represents the ratio of its frequency in the dataset under study as compared to the default *Rattus norvegicus* proteome reference. Statistically overrepresented categories were determined by the binomial test³² with *p*-values after Bonferroni correction lower than 0.05. Besides, in order to unravel the potential pathways involved in the initiation of Cer-induced AP, the soluble or whole membrane clusters of differentially expressed proteins were investigated using the KEGG PATHWAY database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), via DAVID web-based tool v.6.8 (<http://david.ncifcrf.gov/>).^{33,34}

SDS-PAGE and Western blot analyses

The expression levels of selected proteins were further verified by Western blot¹³ in either the soluble or the whole membrane fraction using the 6 samples from the proteomic experiment as well as 5 independent samples per class (n=8) except LAMP2 protein, whose validation was afforded with 11 independent samples (n=11). Additionally, to further assess COPB and COPG protein modulations, postnuclear homogenate samples were used as is described in results. Proteins were analysed by SDS-PAGE using 10 or 15% T gels. The monoclonal antibodies for plasma protease C1 inhibitor, C1inh (1:2000; sc-377062), COPB (1:1000; sc-393615) and COPG (1:1000; sc-393977), and the polyclonal antibodies for α 1-antitrypsin (α 1-antiproteinase or AAT) (1:2000; sc-14586), complement component protein C4 beta, C4 β (1:600; sc-25816), clusterin (1:600; sc-8354), COPD (1:200; sc-28513), fetuin-A (1:2000; sc-28924), hemopexin (1:7500; sc-134443), serpinA3k (1:500; sc-162174), serpinB1/B1a (1:250; sc-343049), T-kininogen 1/2 (1:1000; sc-103886) and vacuolar sorting protein 29, VPS29 (1:1000; sc-134443) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA. The GAPDH (1:40,000; AM4300) monoclonal antibody was obtained from Ambion, Applied Biosystem, Austin, TX, USA. The polyclonal antibodies for haptoglobin (1:1500; GW20080F) and LAMP2

(1:1000; L0668) were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA and the malignant T-cell-amplified sequence 1, MCTS1 (1:150; TA343797), from ORIGENE. Appropriate dilutions of secondary sheep anti-mouse (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK), m-IgGk BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA), rabbit-anti-chicken (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), goat anti-rabbit (Novex, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and donkey-goat (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA) antibodies were used. The blots were visualized by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK). Analyses of the spots on all the blots and the loading control for normalization were performed as previously described.¹³ The images shown in the figures are from blots whose films were exposed for optimal reproduction rather than for the linearity of band densities. Data (means \pm SD) were analysed (IBM SPSS Statistics for Windows, v23, IBM Corp., Armonk, NY) using the non-parametric Mann–Whitney U test. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

RESULTS

Cer treatment leads to the rapid onset of AP

Serum amylase determination, edema and light microscopy of the rat pancreas stained with H & E were used to monitor the initial phases of clinically relevant relatively mild edematous pancreatitis. Two hours after the first injection of Cer, serum amylase activity and edema (as evidenced by the increase in pancreatic wet weight) were increased significantly. Also, histological sections of the pancreata evidenced acinar cell disruption and scarce lymphocytes were observed outside of the vessels (Supporting Information Fig. 1). These features are characteristic of the onset of our model of Cer-induced AP as previously reported.^{13,21,35}

Quantitative MS analysis of protein profiles

The shotgun proteomic experiment involving sixplex tandem mass tag (TMT⁶) labeling allowed the simultaneous identification and quantification of the early phase of AP proteome from the soluble and the whole membrane pancreatic fractions from three AP and three control animals. A total of 997 different proteins were identified with at least two distinct peptides (555 and 686 in the soluble or the whole membrane fractions, respectively). Proteins sharing the same set or subset of peptides were considered as a single entry. Peptides assigned to multiple protein hits were not considered for quantification and all the identified protein groups could be quantified with at least one spectrum using Isobar package. Spiked-LACB quantification was checked for quality control and no particular experimental bias was observed. Three hundred and fifty three different proteins were found differentially expressed significantly ($p < 0.05$) (298 and 77 in the soluble or the whole membrane pancreatic fractions, respectively). Of them, 22 were present in both fractions, 276 were exclusive of the soluble fraction and 55 were exclusive of the whole membrane fraction. Also, 64 and 38 were overexpressed and 234 and 39 were underexpressed in the soluble or the whole membrane pancreatic fractions of AP animals, respectively. Of them, 10 were overexpressed in both fractions, 4 were underexpressed in both fractions and 8 were overexpressed in the soluble fractions and underexpressed in the whole membrane fraction. Also, 119 were found to be differentially expressed only in one of the fractions: 106 in the soluble and 13 in the whole membrane fractions, respectively. All protein identification and quantification details including statistics are available in Supporting Information File S1 and S2.

The technical efficiency of the TMT⁶ experiments was assessed by the peptide labeling rate and the peptide relative intensity distribution of LACB-among the 6 tags. The percentage of TMT tagging (calculated as the proportion of peptides having a TMT at the N-terminus within the total identified peptides) was $\geq 97\%$ in both samples, demonstrating the feasibility of the approach.

The relevant MS data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via PRIDE with the identifier x123.³⁶

Functional enrichment analysis

To gain more insights on the processes and functions that were modulated during the onset of Cer induced AP, GO terms and PANTHER classes enrichment analysis of the up and down differentially expressed proteins were conducted for either the soluble and the membrane-associated fraction datasets. According to previous studies, the analyses of up and downregulated proteins separately enhances the statistical power for detecting disease-associated pathways.³⁰ Our results showed that the main PANTHER protein classes for the soluble overexpressed proteins were complement components, serine protease inhibition and transfer/carrier proteins, while soluble underexpressed proteins were mainly classified into enzyme-related terms (i.e. hydratase, metalloprotease, dehydrogenase, transferase, ligase, oxidase or reductase). The complement component was also enriched among the membrane upregulated proteins, as well as small GTPase and cation transporter, whereas vesicle coat protein and translation elongation factor were significantly overrepresented on the membrane downregulated dataset (Supl. File S3, S4, S5 and S6).

Regarding the GO terms enrichment, the top 10 most represented terms for each GO category [biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF)] are displayed in figure 1 (no parent terms included). The soluble proteins found to be increased were associated with inflammatory and stress responses, which are major pathobiological pathways in AP, while a plethora of metabolic processes and mitochondrial activities were observed among the decreased proteins. In the total membrane fraction, overexpression is also associated with inflammation, as well as lipid and lipoprotein functions, and intracellular transport categories (i.e. vesicle and protein transport, COPI vesicle

coat, Arp2/3 protein complex) are significantly downregulated. Additionally, the same enrichment analysis was performed for the 298 soluble and the 77 membrane-associated differentially expressed proteins, with a view to reveal altered processes comprising both over and underexpressed products (Supl. File S7 and S8). Of note, cytoskeleton activities and lysosomal terms, or late endosome and intracellular signaling transduction were observed in the soluble and membrane DE datasets, respectively.

To understand the potential pathobiological pathways involved in the early phase of AP, we further investigated the total DE proteins of each subcellular fraction experiment using KEGG PATHWAY database. 31 and 9 pathways were found to be involved (Table 1). A prevailing modulation of metabolic pathways (i.e. TCA, pentose phosphate pathway, fatty acid degradation) and pancreatic secretion were observed among the regulated soluble proteins. The DE proteins from the whole membrane extract were particularly associated to endocytosis and pancreatic secretion, besides AMPK and cAMP signaling (complete enrichment analyses for up and down, or total DE datasets are compiled in Supl files S1-S9).

Verification of protein expression levels by Western blotting

To verify the reliability of the quantitative proteomic results of both subcellular pancreatic fractions, we performed immunoblot experiments on particular species of the top-differentially expressed proteins. Selection was based on their biological functions and proteomics ratios. A 1.25-fold change threshold was considered on TMT ratios (≥ 1.25 increased or ≤ 0.80 decreased ratios, $p < 0.05$) in order to reduce false-positive rates in the verification of differentially modulated proteins (with the exception of COPB from the whole membrane dataset, whose immunoblot was performed in a view to obtain a more complete evaluation of the COPI vesicle dynamics). This cut-off threshold was selected according to a TMT pilot study comparison of twice the same sample that gave a mean coefficient of

variation below 12.5% as well as described elsewhere.²⁹ The 19 proteins selected for verification are listed in Table 2, and immunoblots are shown in figures 2 and 3. With a view to a better interpretation of the results, the proteins were quantified (graphics of figures 2 and 3) with respect to the total amount of proteins in the whole pancreas because it is well known that pancreatitis is associated with the neutrophil infiltration and cell death that differentiate the cell composition of the pancreata of the groups of rats.

Among the different validated proteins, clusterin in the soluble fraction and LAMP-2 in the whole membrane fraction deserve some consideration. Many different bands of proteins were visible in the blot of clusterin, probably because clusterin biogenesis is extremely complicated as the protein undergoes multiple modifications during its passage through the secretory pathway. It is known that three different isoforms can be formed from the full-length clusterin: a low glycosylated monomeric form (55-65 kDa) and a highly glycosylated monomer (80 kDa form) whose proteolytic cleavage generates a secreted heterodimeric third form with α and β subunits of 35-40kDa.³⁷ Here we detected a clear increase in the amount of proteins both in the range of 35-40 kDa and 55-70 kDa, confirming therefore quantitative proteomic data. Analysis of LAMP-2 yielded also a complex picture mainly because its expression level changed a lot among samples. In fact, from a maximum of 11 different samples analysed by immunoblotting, it was more or less overexpressed in 7 samples (AP/C ratio of 1.2 to 3.2), underexpressed in 2 samples (AP ratio of 0.4 to 0.6) and without changes in 2 samples. The mixture of this data gave the results shown in figures 2 and 3, and confirmed the proteomic data. Nevertheless, it has been described that LAMP-2 decreased its expression level in fully developed AP. In fact, we analysed previously LAMP-2 expression in whole post-nuclear homogenates of pancreas³⁸ or the whole membrane fraction (this work, data not shown) from fully developed Cer-induced AP, observing that LAMP-2 was indeed dramatically

underexpressed. This finding is consistent with previously reported data from us³⁸ and others.³⁹

DISCUSSION

Alterations in gene expression within the initiation phase of AP play an important role in its development.⁵ Taken this into account, we have previously divided the development of our animal model of AP into early, intermediate and later (2, 4 and 9 h after the first injection of Cer, respectively) phases of AP.^{20,21} The shotgun proteomic approach used in this work has led us to obtain a comprehensive image of the pancreas during such an early phase of Cer-induced AP in rats. For that objective, an important premise to be taken into account is that proteins can increase either through synthesis or migration into the pancreas and decrease by degradation or secretion. Also, to decrease complexity, we fractionated the pancreas into two subcellular fractions, the soluble and the whole membrane fractions.

Several proteins involved in inflammatory responses were overexpressed in the soluble fraction of rat pancreatic tissue. Among them, we validated here the overexpression of the acute-phase proteins haptoglobin, hemopexin and AAT. Besides, we have previously reported by using 2-DE and MS/MS that two other inflammatory proteins: α -1 macroglobulin and A1I3 also increase their concentrations during the early phase of AP (two hours after the first injection of Cer).¹³ Accordingly, the overexpression of these inflammatory proteins is an early phenomenon during the onset of Cer-induced AP, that has also been described to occur in fully developed models of AP.¹² The overexpression of haptoglobin and hemopexin, two hemoglobin scavengers proteins, might be due to the increased vascular permeability associated with AP. AAT is an acute-phase protein expressed in macrophages that inhibits neutrophil elastase. In this sense, its early overexpression might be related to the early formation of edema and macrophage infiltration associated with the inflammatory response. Other

important proteins implicated in the inflammatory response are kinins. Here we validated an increase of the low molecular weight like-kininogen called T-kininogens 1/2 which act as precursors of the active peptide bradykinin, a potent vasodilator with permeability-enhancing properties, which might participate in the edema formation. It is interesting to note that bradykinin elicits a Ca^{2+} signal that may have a negative effect on the outcome of acute disease processes, and that the blockade of calcium entry has been proposed to have potential therapeutic utility in the management of AP.⁴⁰

Other inflammatory-related proteins validated here are serine protease inhibitor A3K (Serpina3k) and plasma protease C1 inhibitor (Serpin1, C1INH). These members of the serpin superfamily, as well as SerpinB6, validated by us in a previous work,¹³ are proteins secreted in plasma that inhibits trypsin-like proteases, as well as kallikreins, the proteases that release kinins from the larger precursors kininogens. Accordingly, serpins overexpression might indicate a protective role of these proteins as from the early phases of Cer-induced AP. In this sense, it is well known that C1INH inhibits bradykinin formation via inactivation of kallikrein among other plasma factors. On the other hand, leukocyte elastase inhibitor A (Serpina1a) was underexpressed as it has been reported in different model of fully developed models of AP,^{12,16} SerpinB1 acts as a fast-acting stoichiometric proteinase inhibitor that regulates the activity of neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3. Neutrophil elastase is secreted by neutrophils and has proteolytic effects, especially on components of the extracellular matrix. Neutrophils are rapid responders in inflammation and play an important role in AP development. Since serpins inhibit proteases by a suicide substrate inhibition mechanism, SerpinB1a underexpression detected here might be indicative of a rapid protective role in Cer-induced AP, with the protease-SerpinB1a complex being rapidly degraded.

Clusterin, another protective protein that has been described to be part of the pancreatic stress response,⁴¹ has been described to be overexpressed in fully

developed models of AP and its protective role during inflammation of exocrine pancreas seems to be due to its anti-apoptotic and anti-inflammatory functions.⁴² Here, we validated the overexpression of these proteins as an early phenomenon during the onset of Cer-induced AP.

Fetuin A, a secretory glycoprotein of hepatic origin, is a member of cystatin superfamily of protease inhibitors. Its functions include inhibition of vascular calcification, bone metabolism regulation, control of protease activity, insulin resistance, keratinocyte migration, and breast tumor cell proliferative signaling. Fetuin A has both pro and anti-inflammatory attributes. As a positive acute phase protein, fetuin A was reported to induce the expression of inflammatory cytokines in adipocytes and macrophages, and as a negative acute phase protein, fetuin A was found to play a protective or anti-inflammatory role in various disease conditions such as infection, sepsis, endotoxemia, trauma, cerebral ischemic injury, autoimmune disorders and Alzheimer's disease.⁴³ It has been observed an inverse correlation of human plasma fetuin A with the presence and the severity of inflammation in the course of AP.⁴⁴ In relation to its anti-inflammatory function, fetuin A decreases the synthesis of pro-inflammatory cytokines in macrophages and stimulates phagocytosis, but cytokines regulate as well the production and release of fetuin A. The increase level of fetuin A observed by us here could represent an early protective mechanism, reflecting the early release of various cytokines produced in AP.⁴⁵ Also, since fetuin A is a link between inflammation and alterations in calcium metabolism in acute and chronic inflammatory conditions, it might help in the protection against the calcium signals elicited by the kinins mentioned above.

Another verification was performed for coatomer subunits which are associated with the early steps of acinar cell secretory pathway. Coatomers, which are free in the cytoplasm, associate with vesicles participating in the transport of proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex during protein biosynthesis. The analysis of coatomers COPB, COPD and COPG

(members of the COPI type vesicle) in our system is interesting because the expression levels of some of them changed in opposite directions between the soluble and the whole membrane fraction of the pancreas. Indeed, the underexpression of both COPB and COPG associated to membranes results in an overexpression in the soluble fraction. Interestingly, we did not detect changes in the expression of COPB and COPG in whole postnuclear homogenates of the pancreas of control or pancreatic rats obtained during the same early phase of Cer-induced AP described here (data not shown). This data seems to indicate some kind of redistribution of the coatomers during the early phase of Cer-induced AP. Besides, the decrease in the coatomer expression associated with membranes, and consequently with vesicles transporting proteins, might indicate a reduction in protein trafficking, that could be related to the endoplasmic reticulum stress, early on in Cer-induced AP. Such reduction in trafficking might be important in the secretion blockage that is associated with AP. A reduction in the formation of the vesicles is also consistent with the reduction of Arfgap3 protein in the membrane fraction according with our proteomic data (result not validated here), because Arfgap3 seems to be essential for the formation of the COPI vesicle promoting coat lattice.⁴⁶

The modulations of coatomers described here is different to that described during the onset of taurocholate-induce necrotizing AP.¹⁶ In this model, it seems that coatomer expression decreases in early steps before going back in latter steps. Besides, many coatomer degradation products were formed, and no reliable and interpretable results were obtained. Here, we have not detected any degradation product, may be because our model mimics an oedematous non-necrotizing AP.

Vacuolar sorting proteins are required for proper trafficking of endocytic and biosynthetic proteins to the vacuole and play an important role in the budding process of cells. Vacuolar protein sorting-associated protein 29 (VPS29) exists as a component of a large multimeric retromer complex that play an important

role in retrograde transport of proteins from endosomes to the trans-Golgi network. The underexpression of VPS29 detected here in the membrane fraction might indicate an early alteration in the function of the vacuolar system. To the best of our knowledge, this is the first description of alterations in VPS29 in AP.

Malignat T-cell-amplified sequence 1 (MCTS-1) has been described to be a regulator of the MEK-ERK signaling pathway.⁴⁷ Besides, under cellular stress, the knockdown of MCTS-1 enhances apoptotic cell death accompanied with the activation of caspases. The validation of the underexpression of MCTS-1 in the whole membrane fraction detected here could be relevant since it has been well described that Cer activates the MAPK cascade early on in the development of AP.^{35,48} Also, acinar cell apoptosis has been reported in different models of AP.⁴⁹ MCTS-1 has also been described to decrease in a proteomic analysis of a necrotizing model of AP, although it was not validated with a second technique.¹⁶

Complement C4, a member of the α_2 -macroglobulin family has been used also to validate our proteomic analysis in the whole membrane fraction, although in the absence of some kind of ionic interaction with some membrane-associated protein, it is probable that its location in the membrane fraction could be due to the presence of residual soluble proteins.

Gene Ontology and pathway enrichment characterization revealed a general recession on metabolic processes such as glycolysis, tricarboxylic acid cycle or fatty acid beta-oxidation, and a significant increase in proteins associated with protective functions and responses to injury and inflammatory and stress insults. Altogether, bioinformatic characterization of the proteomic alterations described here contributes to elucidate the potential mechanisms of pathogenesis involved in the onset of AP at the molecular level. (Figure 4).

CONCLUSSIONS

We performed in a rat pancreatic model a high-throughput shotgun proteomic profiling of the soluble and the whole membrane fractions from the pancreas

during the early phase of Cer-induced AP since unmasking of rapid early events would be important for the study of AP at the molecular level. Also, we explore the processes and mechanisms potentially implied in the onset of AP. Our findings revealed that the proteins whose expression was early modulated during the onset of the disease were implicated in molecular mechanisms including vesicle-mediated and protein transport, lysosomal and mitochondrial impairment or proteolysis. Also, many metabolic processes were downregulated and an increase in inflammatory and stress responses was highlighted. Proteins that were associated with the development of AP for the first time include VPS29 and MCTS1. Also, to our knowledge, the imbalance of some COP proteins during this early phase is shown for the first time. Besides, our data seems to indicate that the LAMP2 decrease probably occurs later on in the onset of AP. Probably our subcellular fractionation protocol has allowed the detection of changes in more different membrane proteins, as well as the regulation in the expression of soluble/secreted and plasmatic proteins that could be good candidates as early biomarkers of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Spanish grant PI15/01156 [FEDER -FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias)]. V. García-Hernández was a recipient of a Spanish predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU2010-2350) and a EMBO Short-Term fellowship (ASTF523-2014).

REFERENCES

- (1) Frossard, J. L.; Steer, M. L.; Pastor, C. M. Acute pancreatitis, *Lancet* **2008**, *371*, 143-152.
- (2) Singh, P.; Garg, P. K. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding, *Indian J. Gastroenterol.* **2016**, *35*, 153–166.

- (3) Manohar, M.; Verma, A. K.; Venkateshaiah S. U.; Sanders, N. L.; Mishra, A. Pathogenic mechanisms of pancreatitis, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **2017**, *8*, 10-25.
- (4) Pandol, S. J.; Saluja, A. K.; Imrie, C. W.; Banks, P. A., Acute pancreatitis: bench to the bedside, *Gastroenterology* **2007**, *132*, 1127-1151.
- (5) Ji, B.; Chen, X.; Misek, D. E.; Kuick, R.; Hanash, S.; Ernst, S.; Najarian, R.; Logsdon, C. D. Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator, *Physiol. Genomics* **2003**, *14*, 59-72.
- (6) Alonso, R.; Montero, A.; Arévalo, M.; García, L. J.; Sánchez-Vicente, C.; Rodríguez-Nodal, F.; López-Novoa, J. M.; Calvo, J. J. Platelet-activating factor mediates pancreatic function derangement in caerulein-induced pancreatitis in rats, *Clin. Sci.* **1994**, *87*, 85-90.
- (7) Pescador, R.; Manso, M. A.; Revollo, A. J.; de Dios, I. Effect of chronic administration of hydrocortisone on the induction and evolution of acute pancreatitis induced by cerulein, *Pancreas* **1995**, *11*, 165-72.
- (8) Zhao, M.; Xue, D. B.; Zheng, B.; Zhang, W. H.; Pan, S. H.; Sun, B. Induction of apoptosis by artemisin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis, *World J. Gastroenterol.* **2007**, *14*, 5612-5617.
- (9) Williams, J. A. Proteomics as a systems Approach to pancreatitis, *Pancreas* **2013**, *42*, 905–911.
- (10) Yu, J. H.; Yun, S. Y.; Lim, J. W.; Kim, H.; Kim, K. H. Proteome analysis of rat pancreatic acinar cells: implication for cerulein-induced acute pancreatitis, *Proteomics* **2003**, *3*, 2446-2453.
- (11) Yu, J. H.; Seo, J. Y.; Kim, K. H.; Kim, H. Differentially expressed proteins in cerulein-stimulated acinar cells: implication for acute pancreatitis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 503-516.
- (12) Fétaud, V.; Frossard, J. L.; Farina, A.; Pastor, C. M.; Bühler, L.; Dumonceau, J.-M.; Hadengue, A.; Hochstrasser, D. F.; Lescuyer, P. Proteomic profiling in an animal model of acute pancreatitis, *Proteomics* **2008**, *8*, 3621–3631.
- (13) García-Hernández, V.; Sánchez-Bernal, C.; Sarmiento, N.; Viana, R.; Ferreira, L.; Pérez, N.; Calvo, J. J.; Sánchez-Yagüe, J. Proteomic analysis of the soluble and the lysosomal+mitochondrial fractions from rat pancreas: Implications for cerulein-induced acute pancreatitis, *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1842*, 1058-1067.
- (14) Lassout, O.; Pastor, C. M.; Fétaud-Lapierre, V.; Hochstrasser, D. F.; Frossard, J. L.; Lescuyer, P. Analysis of the pancreatic low molecular weight proteome in an animal model of acute pancreatitis, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 4535-4544.

- (15) Fétaud-Lapierre, V.; Pastor, C. M.; Farina, A.; Hochstrasser, D. F.; Frossard, J. L.; Lescuyer, P. Proteomic analysis of heat shock-induced protection in acute pancreatitis, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 5929-5942.
- (16) Fétaud-Lapierre, V.; Pastor, C.M.; Costa, M.J.; Hochstrasser, D.F.; Morel, D.R., Frossard, J. L.; Lescuyer, P. Time-course proteomic analysis of taurocholate-induced necrotizing acute pancreatitis, *J. Proteomics* **2013**, *85*, 12-27.
- (17) Chen, X.; Sans, M.D.; Strahler, J.R.; Karnovsky, A.; Ernst, S. A.; Michailidis, G., Andrews, P.C.; Williams, J. A. Quantitative organellar proteomics analysis of rough endoplasmic reticulum from normal and acute pancreatitis rat pancreas, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 885-896.
- (18) Chen, R., Brentnall, T. A.; Pan, S.; Cooke, K.; Moyest, K. W.; Lane, Z., Crispin, D. A.; Goodle, D. R.; Aebersold, R. Quantitative proteomics analysis reveals that proteins differentially expressed in chronic pancreatitis are also frequently involved in pancreatic cancer, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1331-1342.
- (19) Rauniyar, N., Yates, J. R. (). Isobaric Labeling-Based Relative Quantification in Shotgun Proteomics. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 5293–5309.
- (20) Sarmiento, N.; Sánchez-Bernal, C.; Ayra, M.; Pérez, N.; Hernández-Hernández, A.; Calvo, J. J.; Sánchez-Yagüe, J. Changes in the expression and dynamics of SHP-1 and SHP-2 during cerulein-induced acute pancreatitis in rats, *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1782*, 271-279.
- (21) Sarmiento, N.; Sánchez-Bernal, C.; Pérez, N.; Sardina, J. L.; Mangas, A.; Calvo, J. J.; Sánchez-Yagüe, J. Rolipram and SP600125 suppress the early increase in PTP1B expression during cerulein-induced acute pancreatitis in rats, *Pancreas* **2009**, *39*, 639-645.
- (22) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- (23) Dayon, L.; Sanchez, J. C. Relative protein quantification by MS/MS using the tandem mass tag technology. *Meth Mol Biol.* **2012**, *893*, 115–27. Epub 2012/06/06. pmid:22665298.
- (24) Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- (25) Rabilloud, T.; Carpentier, G.; Tarroux, P. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 288–291
- (26) Licker, V.; Turck, N.; Kövari, E.; Burkhardt, K.; Côte, M.; Surini-Demiri, M.; Lobrinus, J. A.; Sanchez, J. C.; Burkhard, P. R. Proteomic analysis of human substantia nigra identifies novel candidates involved in Parkinson's disease pathogenesis. *Proteomics* **2014**, *14*, 784-794.

- (27) Gluck, F.; Hoogland, C.; Antinori, P.; Robin, X; et al. EasyProt—an easy-to-use graphical platform for proteomics data analysis. *J. Proteomics* **2013**, *79*, 146–160.
- (28) Dayon, L.; Pasquarello, C.; Hoogland, C.; Sanchez, J. -C.; Scherl, A. Combining low- and high-energy tandem mass spectra for optimized peptide quantification with isobaric tags, *J. Proteomics*, **2010**, *73*, 769-777.
- (29) Breitwieser, F. P.; Muller, A.; Dayon, L.; Kocher, T.; et al., General statistical modeling of data from protein relative expression isobaric tags. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 2758–2766.
- (30) Hong, G.; Zhang, W.; Li, H.; Shen, X.; Guo, Z. Separate enrichment analysis of pathways for up- and downregulated genes. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20130950. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2013.0950>
- (31) Mi, H.; Huang, X.; Muruganujan, A.; Tang, H.; Mills, C.; Kang, D.; Thomas, P. D. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucl. Acids Res.* (2016) doi: 10.1093/nar/gkw1138.
- (32) Cho, R. J.; Campbell, M. J. Transcription, genomes, function. *Trends Genet.* **2000**, *16*, 409–415.
- (33) Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* **2009**, *4*, 44-57.
- (34) Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1-13.
- (35) García-Hernández, V.; Sarmiento, N.; Sánchez-Bernal, C.; Matellán, L.; Calvo, J. J.; Sánchez-Yagüe, J. Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis, *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1842*, 192-201.
- (36) Savkovic, V.; Gantzer, H.; Reiser, U.; Selig, L.; Gaiser, S.; Sack, U.; Klöppel, G.; Mössner, J.; Keim, V.; Horn, F.; Bödeker H. Clusterin is protective in pancreatitis through anti-apoptotic and antiinflammatory properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *356*, 431–437.
- (37) Vizcaíno, J. A; Deutsch, E. W.; Wang, R.; Csordas, A.; Reisinger, F.; Ríos, D.; Dianes, J. A.; Sun, Z.; Farrah, .T; Bandeira, N.; Binz, P. A.; Xenarios, I.; Eisenacher, M.; Mayer, G.; Gatto, L.; Campos, A.; Chalkley, R. J.; Kraus, H.J.; Albar, J.P.; Martinez-Bartolomé, S.; Apweiler, R.; Omenn, G. S.; Martens, L.; Jones, A. R.; Hermjakob, H. ProteomeXchange provides globally co-ordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 223-226.

- (38) García-Hernández, V.; Sarmiento, N.; Sánchez-Bernal, C.; Coveñas, R.; Hernández-Hernández, A.; Calvo, J. J.; Sánchez-Yagüe, J. Changes in the expression of LIMP-2 during cerulein-induced pancreatitis in rats: Effect of inhibition of leukocyte infiltration, cAMP and MAPKs early on in its development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *72*, 109-117.
- (39) Gukovsky, I.; Pandol, S.J.; Mareninova, O.A.; Shalbueva, N.; Jia, W.; Gukovskaya, A.S. Impaired autophagy and organellar dysfunction in pancreatitis, *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *27*, 27-32.
- (40) Hegyi, P. Blockade of calcium entry provides a therapeutic window in acute pancreatitis. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 257-
- (41) Calvo, E. L.; Mallo, G. V.; Fiedler, F.; Malka, D.; Vaccaro, M. I.; Keim, V.; Morisset, J.; Dagorn, J. C.; Iovanna, J. L. Clusterin overexpression in rat pancreas during the acute phase of pancreatitis and pancreatic development. *Eur J Biochem.* **1998**, *254*, 282-289.
- (42) Savkovic, V.; Gantzer, H.; Reiser, U.; Selig, L.; Gaiser, S.; Sack, U.; Klöppel, G.; Mössner, J.; Keim, V.; Horn, F.; Bödeker, H. Clusterin is protective in pancreatitis through anti-apoptotic and anti-inflammatory properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *356*, 431-437.
- (43) Sindhu, S.; Akhter, N.; Shenouda, S.; Wilson, A.; Ahmad, R. Plasma fetuin-A/ α 2-HS-glycoprotein correlates negatively with inflammatory cytokines, chemokines and activation biomarkers in individuals with type-2 diabetes. *BMC Immunology* **2016**, *17*, 33
- (44) Kuśnierz-Cabala, Gurda-Duda, A.; Panek, J.; Fedak, D.; Dumnicka, P.; Solnica, B.; Kulig, J. Serum fetuin A concentrations in patients with acute pancreatitis. *Clin Lab.* **2010**, *56*, 191-195.
- (45) Staubli, S. M.; Oertli, D.; Nebiker, C. A. Laboratory markers predicting severity of acute pancreatitis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2015**, *52*, 273-283.
- (46) Kartberg, F.; Asp, L.; Dejgaard, S. Y.; et al. ARFAP2 and ARFGAP3 Are Essential for COPI Coat Assembly on the Golgi Membrane of Living Cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 36709-36720.
- (47) Shih, H. -J.; Chen, H. -H.; Chen, Y. -A.; et al. Targeting MCT-1 oncogene inhibits Shc pathway and xenograft tumorigenicity. *Oncotarget.* **2012**, *3*, 1401-1415.
- (48) Minutoli, L.; Altavilla, D.; Marini, H.; Passaniti, M.; Bitto, A.; Seminara, P.; Venuti, F. S.; Famulari, C.; Macri, A.; Versaci, A.; Squadrito, F.; Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis, *Life Sci.* **2004**, *75*, 2853-2866.

(49) Zhang, J.; Rodney, L. Rouse. Histopathology and pathogenesis of caerulein-, duct ligation-, and arginine-induced acute pancreatitis in Sprague-Dawley rats and C57BL6 Mice. *Histol. Histopathol.* **2014**, *29*, 1135-1152.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Gene Ontology (GO) enrichment analysis of the significantly up and down-regulated proteins during the early phase of Cer-induced AP. GO analyses were performed on the soluble fraction (A) or the whole membrane fraction (B) datasets. The figure shows the top-10 most enriched terms (by fold enrichment; Bonferroni correction, $p < 0.05$) for the following categories: biological process (BP), in green; cellular component (CC), in blue; molecular function (MF), in yellow. Complete enrichment analysis and the proteins associated with these terms are provided in Supplementary Information, Files S1-S4.

Figure 2. Immunoblot verification of selected proteins from the soluble fraction that change their expression levels during the early phase of Cer-induced AP. Proteins (10-15 μg) were separated by 10% SDS-PAGE, and transferred onto PVDF membranes by electroblotting. Immunodetection was performed as described in the Materials and methods section. GAPDH was used as a loading control. 4 control (C) and 4 pancreatic (AP) animals are shown.

Figure 3. Immunoblot verification of selected proteins from the whole membrane fraction that change their expression levels during the early phase of Cer-induced AP. Proteins (20 μg) were separated by 10% (COPB, COPD, COPG, LAMP2, C4 β), 15% (VPS29) or 20% (MCTS1) SDS-PAGE, and transferred onto PVDF membranes by electroblotting. Immunodetection was performed as described in the Materials and methods section. Equal loading of the proteins was assessed by Ponceau S staining of the membranes. 4 control (C) and 4 pancreatic (AP) animals are shown.

Figure 4. Pathogenic mechanisms potentially involved in the onset of Cer-induced AP according to our bioinformatics analysis. Overexpressed terms and proteins are depicted in red, those underexpressed in blue and possible

redistribution is shown in green. Of note, an acinar cell diagram is represented for simplicity because it is the major cell type of the pancreas, although since we analyse the whole pancreas, the changes detected here arised from different cell populations.

Alterations in protein expression during the early phase of experimental pancreatitis: a Tandem Mass Tag (TMT) proteomic analysis

Violeta García-Hernández^{†,‡}, Carmen Sánchez-Bernal^{†,‡}, Domitille Schwartz[§], José J. Calvo^{||,‡}, Jean-Charles Sánchez[§], Jesús Sánchez-Yagüe^{*,†,‡}

[†] Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, Salamanca 37007, Spain

[‡] Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca 37007, Spain

[§] Translational Biomarker Group, Department of Human Protein Sciences, University Medical Center, Geneva, CH

^{||} Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Salamanca 37007, Spain

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology. Edificio Departamental. Lab. 102. Plaza Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca. Spain. E-mail address: sanyaj@usal.es Tel.: +34 923294526; fax: +34 923294579.

Supporting Information

Figure 1. Light microscopy of the rat pancreas stained with H&C (a), serum amylase activity (b) and edema (c) during the early phase of Cer-induced AP. Rats were either administered saline (0.9% NaCl) (control, C) or treated with Cer, as indicated in Materials and methods, and then killed 2 h after the first injection of Cer. In the histological pancreatic sections (a, H&E staining): control animal (photomicrograph A), low magnification of the pancreas showing a normal morphology and 2 h (photomicrograph B) pancreatitis rats. Compare the morphology of normal acini with other acini showing altered morphology (arrows). Note also the different and increasing degree of leukocyte infiltration at 2 h (arrowheads).

File S1. TMT⁶plex identifications and quantifications for the soluble fraction.

File S2. TMT⁶plex identifications and quantifications for the whole membrane fraction.

File S3. GO and PANTHER enrichment analyses of the soluble up-regulated proteins. Complete list of significantly enriched Biological Process (BP), Cellular Component (CC) or Molecular Function (MF) Gene Ontology and PANTHER Protein Class terms associated to the up-regulated soluble proteins dataset (Bonferroni correction, $p < 0.05$).

File S4. GO and PANTHER enrichment analyses of the soluble down-regulated proteins. Complete list of significantly enriched Biological Process (BP), Cellular Component (CC) or Molecular Function (MF) Gene Ontology and PANTHER Protein Class terms associated to the down-regulated soluble proteins dataset (Bonferroni correction, $p < 0.05$).

File S5. GO and PANTHER enrichment analyses of the membrane up-regulated proteins. Complete list of significantly enriched Biological Process (BP), Cellular Component (CC) or Molecular Function (MF) Gene Ontology and PANTHER Protein Class terms associated to the up-regulated membrane fraction proteins dataset (Bonferroni correction, $p < 0.05$).

File S6. GO and PANTHER enrichment analyses of the membrane down-regulated proteins. Complete list of significantly enriched Biological Process (BP), Cellular Component (CC) or Molecular Function (MF) Gene Ontology and PANTHER Protein Class terms associated to the down-regulated membrane fraction proteins dataset (Bonferroni correction, $p < 0.05$).

File S7. GO and PANTHER enrichment analyses of the soluble differentially expressed proteins. Complete list of significantly enriched Biological Process (BP), Cellular Component (CC) or Molecular Function (MF) Gene Ontology and PANTHER Protein Class terms associated to the differentially expressed soluble proteins dataset (Bonferroni correction, $p < 0.05$).

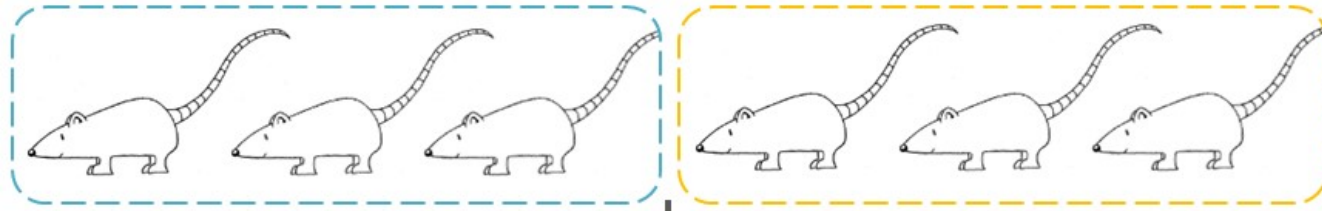
File S8. GO and PANTHER enrichment analyses of the membrane differentially expressed proteins. Complete list of significantly enriched Biological Process (BP), Cellular Component (CC) or Molecular Function (MF) Gene Ontology and PANTHER Protein Class terms associated to the differentially expressed membrane fraction proteins dataset (Bonferroni correction, $p < 0.05$).

File S9. KEGG pathway enrichment analysis of the differentially expressed proteins in the soluble or whole membrane fraction dataset.

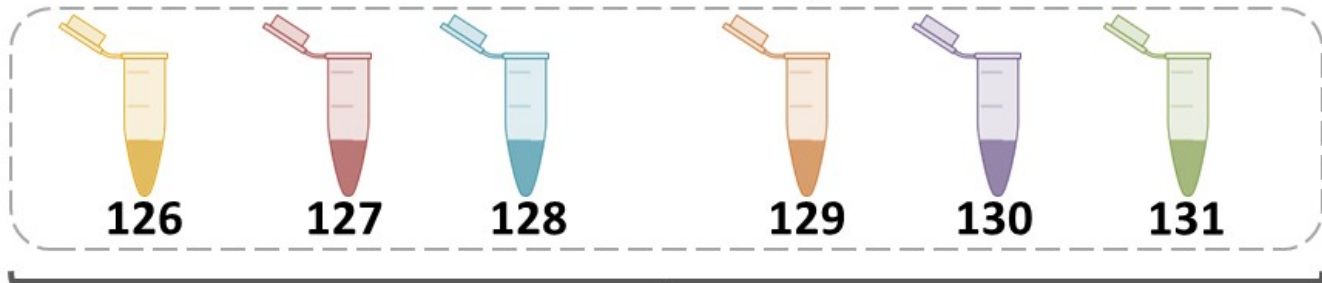
Pancreatic protein extracts

Control

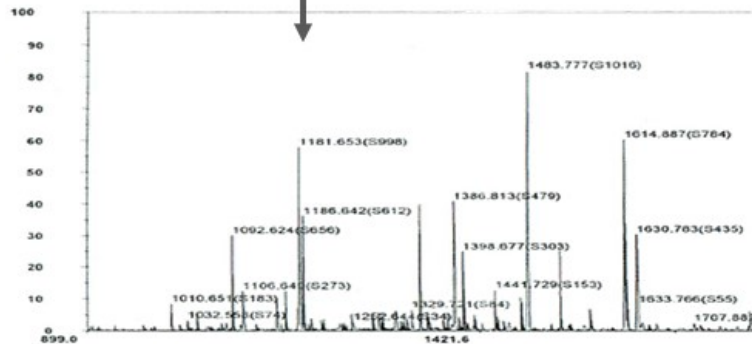
Cer-AP (early phase)



TMT labeling

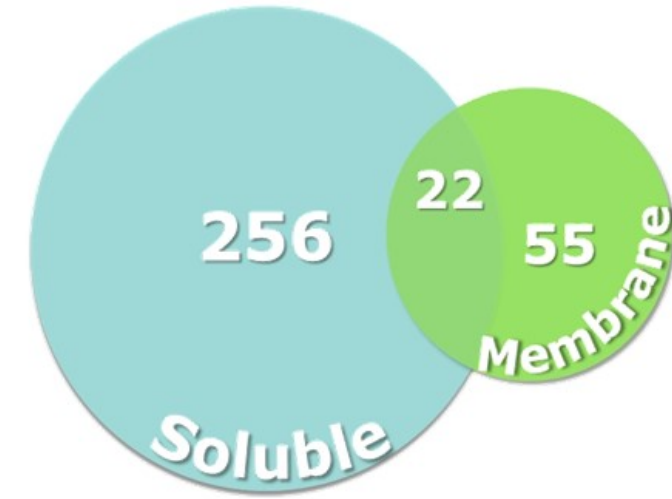


ESI LTQ-OT analyses

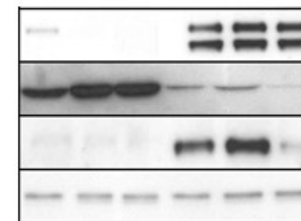


Differentially expressed proteins

(Isobar R, p value < 0.05)



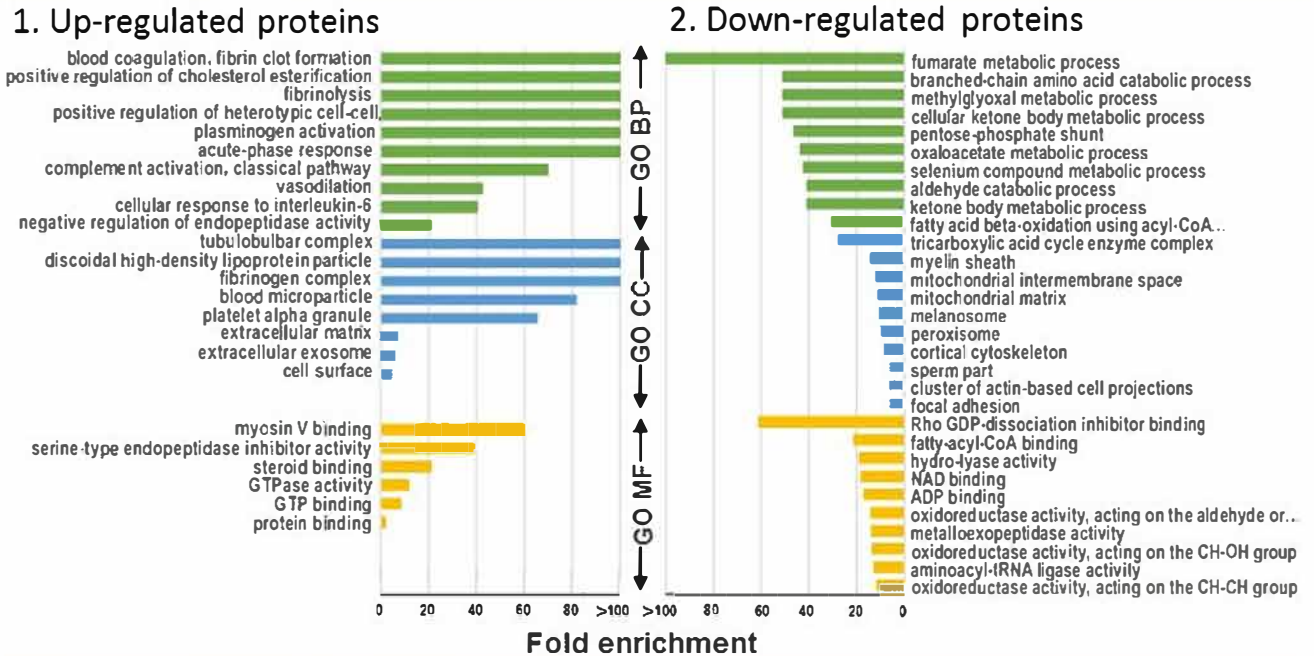
Verification by western blots



GO-PANTHER & KEGG Analysis

Figure 1

A. Soluble fraction



B. Whole membrane fraction

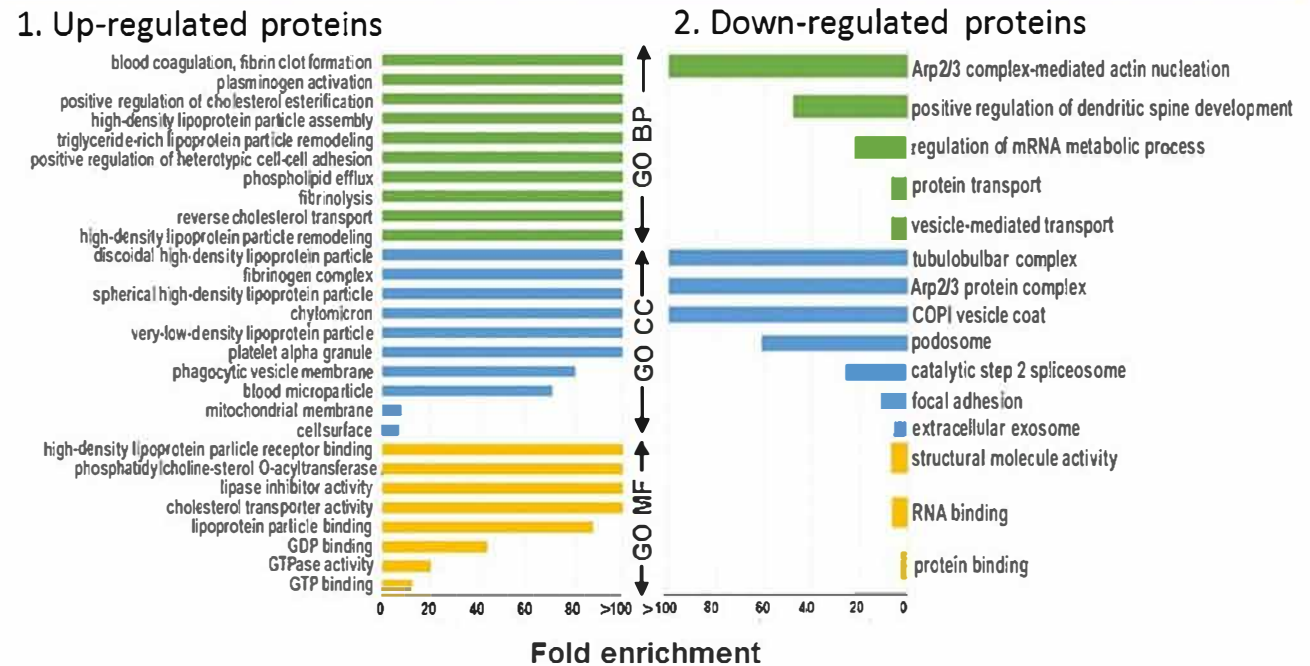


Table 1. KEGG pathways enrichment analysis of differentially expressed proteins.

Pathway ID	Pathway	Count	p value	F.E.
Soluble fraction				
mo00072	Synthesis and degradation of ketone bodies	5	1.19E-04	17.68
mo01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	6	9.04E-05	12.28
mo00020	Citrate cycle (TCA cycle)	9	9.88E-07	10.94
mo00030	Pentose phosphate pathway	8	6.24E-06	10.73
mo00620	Pyruvate metabolism	11	4.16E-08	10.70
mo00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	15	5.63E-11	10.61
mo00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	7	4.91E-05	10.09
mo00270	Cysteine and methionine metabolism	10	5.38E-07	9.73
mo01200	Carbon metabolism	30	7.85E-21	9.64
mo00920	Sulfur metabolism	3	4.22E-02	8.98
mo00650	Butanoate metabolism	6	6.33E-04	8.34
mo00260	Glycine, serine and threonine metabolism	8	4.95E-05	7.98
mo01230	Biosynthesis of amino acids	16	2.04E-09	7.50
mo00071	Fatty acid degradation	9	2.13E-05	7.45
mo00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	13	1.63E-07	7.22
mo00640	Propanoate metabolism	5	5.25E-03	6.95
mo00330	Arginine and proline metabolism	8	2.87E-04	6.10
mo04610	Complement and coagulation cascades	11	1.29E-05	5.94
mo00410	beta-Alanine metabolism	5	1.06E-02	5.72
mo00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	5	1.17E-02	5.56
mo00051	Fructose and mannose metabolism	5	1.42E-02	5.26
mo00500	Starch and sucrose metabolism	4	4.38E-02	5.02
mo00480	Glutathione metabolism	7	3.48E-03	4.69
mo01212	Fatty acid metabolism	6	1.19E-02	4.32
mo04972	Pancreatic secretion	10	7.42E-04	4.05
mo00561	Glycerolipid metabolism	6	1.71E-02	3.96
mo04146	Peroxisome	8	5.90E-03	3.66
mo00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	6	3.13E-02	3.38
mo04612	Antigen processing and presentation	7	3.76E-02	2.81
mo01100	Metabolic pathways	86	8.79E-19	2.59
mo04530	Tight junction	9	2.90E-02	2.47
Whole membrane fraction				
mo04610	Complement and coagulation cascades	5	8.21E-04	11.50
mo04961	Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	3	3.12E-02	10.57
mo04971	Gastric acid secretion	4	9.01E-03	9.07
mo04972	Pancreatic secretion	5	2.39E-03	8.62
mo04260	Cardiac muscle contraction	4	1.08E-02	8.49
mo04611	Platelet activation	5	8.05E-03	6.13
mo04152	AMPK signaling pathway	4	3.88E-02	5.21
mo04024	cAMP signaling pathway	5	2.75E-02	4.24
mo04144	Endocytosis	6	2.63E-02	3.46

Table 2. Selected differentially expressed proteins in the pancreas of AP animals vs controls with a fold change over 1.25.

AC	Protein name	AP/C ratio	Main AP pathogenic hypothesis
Soluble fraction			
Top-overexpressed proteins in the pancreas of AP animals			
P06866	Haptoglobin	5.02	Inflammatory response
P08932	T-kininogen 2	4.96	Inflammatory response. Vasodilation.
P05371	Clusterin	4.25	Response to stress.
P05545	Serine protease inhibitor A3K (Serpina3K)	4.15	Inflammatory response. Serine protease inhibition
P24090	Fetuin A (Alpha-2-HS-glycoprotein)	4.07	Inflammatory response.
P17475	Alpha-1-antitrypsin (AAT)	3.43	Inflammatory response. Serine protease inhibition
P01048	T-kininogen 1	2.97	Inflammatory response. Vasodilation.
P20059	Hemopexin	2.95	Inflammatory response. Scavenging of heme.
Q4AEF8	Coatamer subunit gamma-1	2.38	ER-Golgi transport. Protein transport
P23514	Coatamer subunit beta	2.13	ER-Golgi transport. Protein transport
Q6P734	Plasma protease C1 inhibitor	1.97	Complement pathway. Fibrinolysis
Top-underexpressed proteins in the pancreas of AP animals			
Q4G075	Leukocyte elastase inhibitor A (Serpinb1a)	0.47	Serine protease inhibition
Whole membrane fraction			
Top-overexpressed proteins in the pancreas of AP animals			
P08649	Complement C4	1.99	Complement pathway. Inflammatory response
P17046	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP2)	1.27	Autophagy
Top-underexpressed proteins in the pancreas of AP animals			
B2RZ78	Vacuolar protein sorting-associated protein 29 (VPS29)	0.73	Retrograde transport. Protein transport
Q4G009	Malignant T-cell-amplified sequence 1	0.77	Transcription regulation
Q66H80	Coatamer subunit delta	0.79	ER-Golgi transport. Protein transport
Q4AEF8	Coatamer subunit gamma-1	0.80	ER-Golgi transport. Protein transport
P23514	Coatamer subunit beta	0.86*	ER-Golgi transport. Protein transport

Figure 2

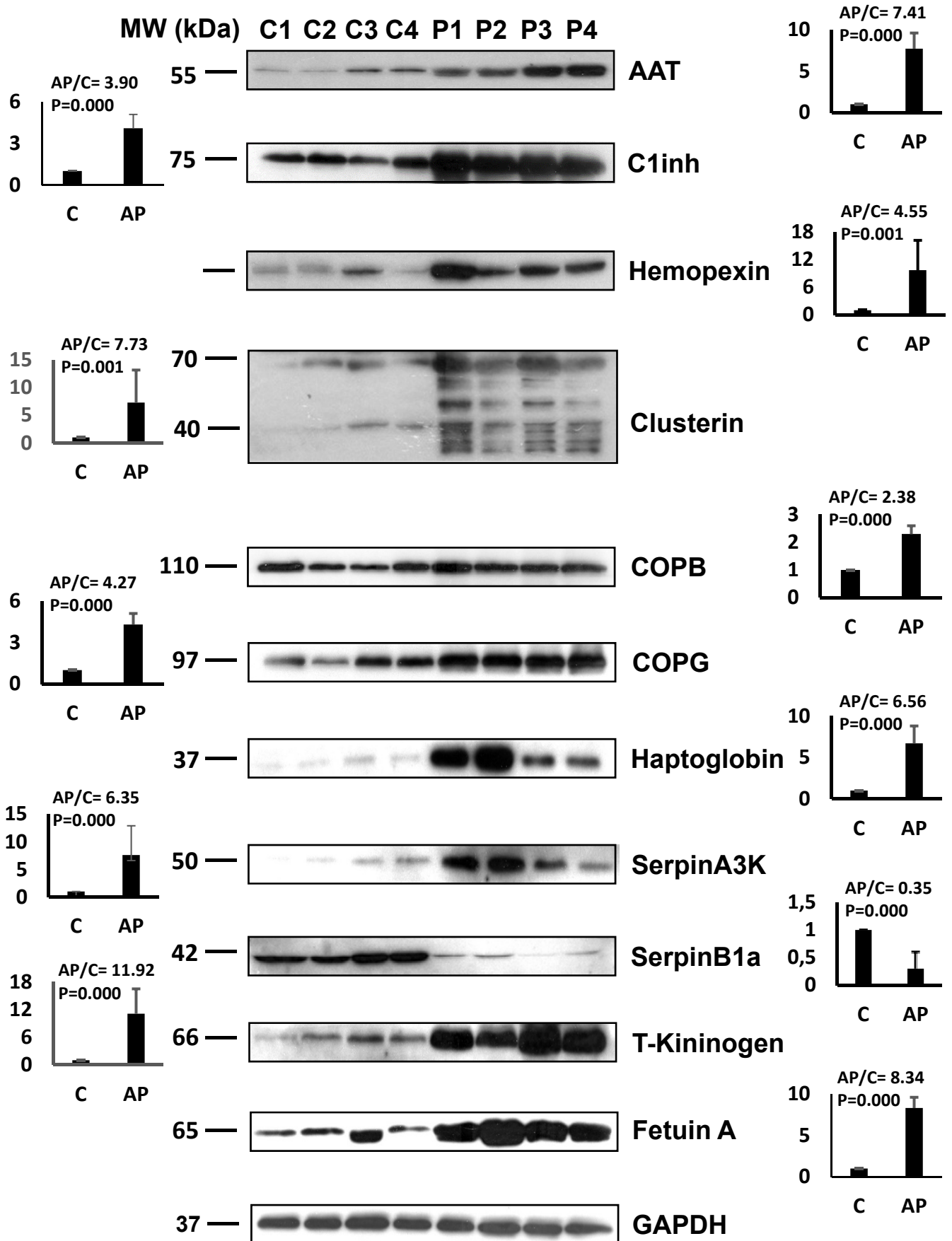


Figure 3

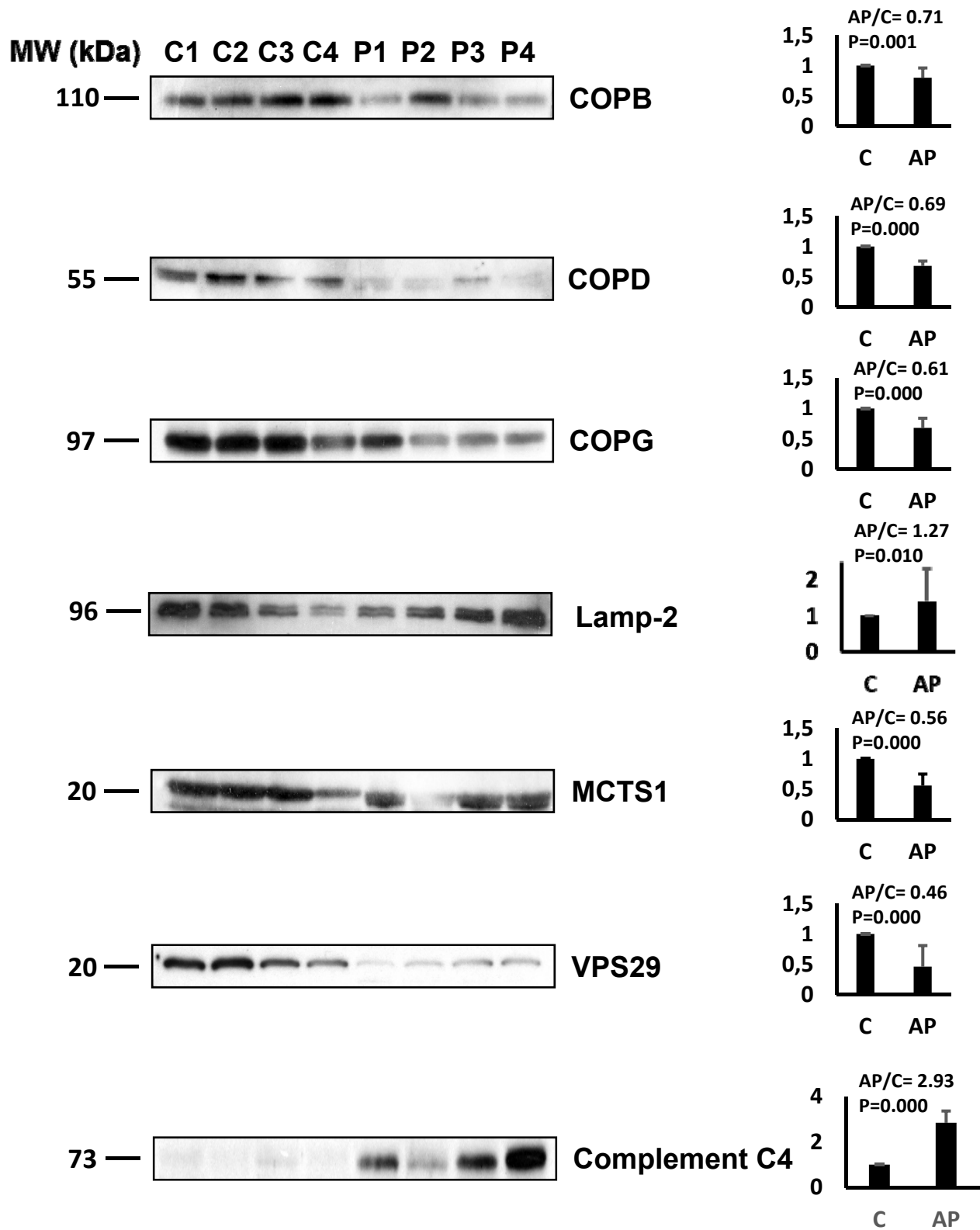
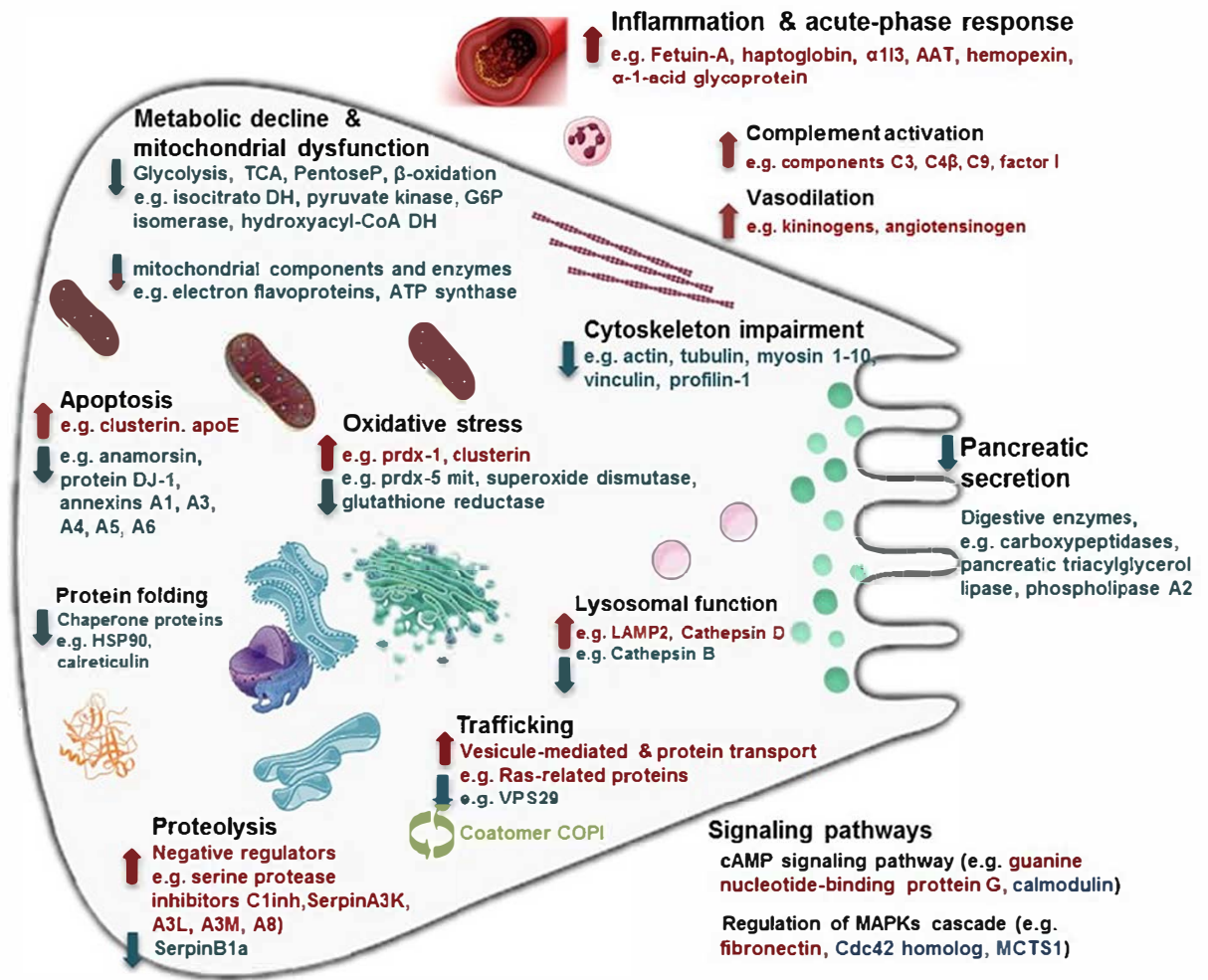


Figure 4



4.

Objetivo 4:

Analizar las especies de MAPKs que modulan los niveles de expresión de SHP-1, SHP-2 y PTP1B durante la fase temprana de la PA inducida por Cer.

Objetivo 5:

Estudiar la influencia de diversos tipos de células inflamatorias en los cambios de expresión de SHP-1, SHP-2 y PTP1B durante la fase temprana de la PA inducida por Cer.



Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats



Violeta García-Hernández^a, Nancy Sarmiento^a, Carmen Sánchez-Bernal^a, Laura Matellán^a, José J. Calvo^b, Jesús Sánchez-Yagüe^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, Spain

^b Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2013

Received in revised form 30 October 2013

Accepted 5 November 2013

Available online 10 November 2013

Keywords:

Experimental acute pancreatitis

SHP-1

SHP-2

PTP1B

MAPK inhibition

Infiltration inhibition

ABSTRACT

The protein tyrosine phosphatases (PTPs) SHP-1, SHP-2 and PTP1B are overexpressed early on during the development of cerulein-induced acute pancreatitis (AP) in rats, and their levels can be modulated by some species of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), the intracellular levels of cAMP and by general leukocyte infiltration, the latter at least for SHP-2 and PTP1B. In this study we show that cerulein treatment activates extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) but not p38 MAPK during the early phase of cerulein-induced AP (2 h after the first injection of cerulein). Therefore, by using the MAPK inhibitors SP600125 (a specific JNK inhibitor) and PD98059 (a specific ERK inhibitor), we have unmasked the particular MAPK that underlies the modulation of the expression levels of these PTPs. JNK would act by preventing SHP-1 protein expression from increasing beyond a certain level. ERK 1/2 was the main MAPK involved in the increase in SHP-2 protein expression due to cerulein. JNK negatively modulated the SH2-domain containing PTPs. Both MAPKs played a role in the increase in PTP1B protein expression due to cerulein. Finally, by using the white blood cell inhibitors vinblastine sulfate, gadolinium chloride and FK506 (tacrolimus), we show that the macrophage activity or T-lymphocytes does not modulate the expression of any of the PTPs, although neutrophil infiltration was found to be a regulator of SHP-2 and PTP1B protein expression due to cerulein.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the course of acute pancreatitis (AP), different pathophysiological responses occur in intrapancreatic regions, including the activation of pancreatic enzymes and inflammatory mediators, the formation of free radicals and changes in blood flow. Some of these factors may also affect peripancreatic tissue or even distant organs. Nevertheless, the molecular mechanisms involved in the development of AP remain incompletely understood, especially the early acinar events, although these signaling mechanisms would determine the development of pancreatitis [1].

One of the animal models of the edematous form of AP is that induced by cerulein (Cer). Under the conditions used here the manifestations of pancreatitis include hyperamylasemia, increased pancreatic weight and pancreatic cell size, edema acinar cell damage, and inflammatory cell infiltration [2–5]. The intracellular mechanisms by which Cer regulate pancreatic acinar function are very complex. Cer modulates

tyrosine phosphorylation [6,7], a central regulatory mechanism of many cell functions, including the maintenance of cell adhesion complexes [8], that are known to be dissociated in pancreatitis [9,10]. Cer-induced AP also activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, which requires the phosphorylation of both tyrosine and threonine residues [11,12]. The adenosine A1-receptor pathway [13], which decreases intracellular cAMP levels, also becomes activated in AP, and increases in intracellular cAMP are known to enhance secretagogue-sensitive zymogen activation. Recently, we have reported that the expression of three different protein tyrosine phosphatases (PTP)—the SH2-domain containing PTPs SHP-1 and SHP-2, as well as PTP1B, is increased at both the gene and protein levels early on in the development of Cer-induced AP [14,15]. It is known that in AP PTPs play roles in the regulation of exocytotic processes in exocrine pancreatic acinar cells [16] and in different inflammatory diseases. Additionally, they may become inactivated by reactive oxygen species or secondary products of oxidation [17] that may form during the development of AP [18], thus affecting protein tyrosine phosphorylation levels (although such a redox-mediated activity modulation has never been confirmed in AP). SHP-1 has been implicated in the Jak–Stat and MAPK pathways [19]. SHP-2 is involved in at least the Ras–Raf–MAPK, Jak–Stat, PI3 kinase and NF-κB pathways [20]. PTP1B is a key controller

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Departamental. Lab. 106, Plaza Doctores de la Reina s/n, 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923294526; fax: +34 923294579.

E-mail address: sanyaj@usal.es (J. Sánchez-Yagüe).

of several cytokine signaling pathways through its influence on members of the Janus kinases/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway [21]. All the above PTP signaling pathways have been implicated in the development of AP. We have also previously reported that the increases observed in the protein levels of the three PTPs during the early phase of Cer-induced AP may somehow be modulated by inhibition of MAPK pathways [14,15], although the specific MAPK implicated in such modulation is unknown. Moreover, leukocyte infiltration seems to affect at least SHP-2 and PTP1B expression in some way [14,15]. It has been recently confirmed that the infiltration of inflammatory cells into the pancreas is an early, central and trigger event in AP [22]. This infiltration causes local and systemic injury in the disease. Not only neutrophils, which are key players in acute inflammatory diseases, but also inflammatory monocytes and macrophages, and even lymphocytes, are involved in the development of acute experimental pancreatitis [23]. In this regard, the attenuation of the proinflammatory immune response by specifically targeting neutrophils, monocytes or lymphocytes improves the early course of several models of experimental pancreatitis [24–26].

In light of the above, here we unmask the particular MAPK that underlies modulation of the expression levels of SHP-1, SHP-2 and PTP1B in the early phase of Cer-induced AP development, by using the MAPK inhibitors SP600125 and PD98059. For comparison, the effect of the increase of cAMP (by inhibiting type IV phosphodiesterase) in the expression levels of the PTPs was also analyzed. Finally, we also studied the influence of different inflammatory cells in the changes in PTP expression by using vinblastine sulfate, which elicits a neutropenic state, gadolinium chloride (GdCl₃), which inactivates macrophage activity, and FK506 (tacrolimus) an immunomodulatory drug that preferentially decreases T-lymphocyte proliferation.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Bovine serum albumin (BSA), cerulein (Cer), dithiothreitol (DTT), FK506, gadolinium chloride (GdCl₃), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), PD98059, Protein Inhibitor Cocktail, rolipram, soybean trypsin inhibitor, SP600125, and vinblastine sulfate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were obtained from Amersham Biosciences, Spain. Monoclonal antibodies anti-PTP-1 (D-11), anti-p-ERK (E-4) and p38 α/β (A-12), and polyclonal antibodies anti-ERK 1 (K-23) and JNK1 (FL) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA. Monoclonal antibody anti-PTP-2 was obtained from BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA. Monoclonal antibody anti-PTP1B (ab52650) was obtained from Abcam, Cambridge, UK. Polyclonal antibodies anti-p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) and anti-p-p38 (Thr180/Tyr182) were acquired from Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA). Monoclonal antibody anti-GAPDH was acquired from Ambion, Inc., Applied Biosystems, Madrid, Spain. Biotinylated anti-rabbit immunoglobulin and avidin–biotin–peroxidase complex were purchased from Vector (Burlingame, CA, USA). The Myeloperoxidase (MPO) Peroxidation Assay Kit was purchased from Cayman Chemical Company, MI, USA. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) enzymatic assay kits were obtained from RAL, Barcelona, Spain.

2.2. Animals

Young male Wistar rats weighing 250–280 g were used. The animals were housed in rooms maintained at 22 \pm 1 °C using a 12-h light/dark cycle and they were fasted for 24 h before experiments, with free access to water. Care was provided in accordance with the procedures outlined in European Community guidelines on ethical

animal research (86/609/EEC), and protocols were approved by the Animal Care Committee of the University of Salamanca.

2.3. Induction of AP and preparation of samples

The early and intermediate phases of AP were induced as described previously [14,15]. Briefly, rats received 2 (early phase) or 4 (intermediate phase) s.c. injections of 20 μ g Cer/kg body weight or its vehicle (0.9% NaCl) at hourly intervals. At 2 or 4 h after the first injection, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg), blood samples were taken from the tail and by cardiac puncture and animals were then killed. The pancreata, which were used immediately for experiments, were rapidly dissected out from the surrounding fat tissue and lymph nodes, and their wet weights rapidly measured. A small portion of the tissue was used for histological studies [14]. The remaining parts of the pancreata were homogenized individually with a Potter Elvehjem device in 4 ml of homogenization buffer (3 mM imidazole buffer, pH 7.4 containing 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 μ g/ml trypsin inhibitor, 100 μ M TPCK and TLCK, 2 μ g/ml Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM NaF and 1 mM Na₃VO₄). Homogenization buffer was added to reach a ratio of 10 volumes (w/v) and a postnuclear homogenate of each pancreas was obtained as described before [27]. Serum samples were stored at –80 °C until amylase determination with a Gernon Star Modular Analyzer, using a RAL assay kit, as reported previously [14]. Protein concentrations were assayed by the method of Bradford [28] using BSA as standard. Special care was taken with this assay in order to minimize deviations in the amount of proteins loaded in each lane of the SDS-PAGE gels. Quality control of the assays was ensured by repeating them at least three times with five different volumes of three-to-five different sample dilutions.

2.4. Light microscopy and immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissue sections (8- to 10- μ m thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E staining), as indicated previously [15], or subjected to immunostaining using the streptavidin peroxidase technique. For the latter, the sections were incubated for 30 min at room temperature in phosphate-buffered saline (0.15 M, pH 7.2) containing 1% normal horse serum and 0.3% Triton X-100 (buffer A) before overnight incubation at 4 °C with anti-PTP1B polyclonal antibody diluted 1:50. Bound antibody was detected with a biotinylated anti-rabbit immunoglobulin (Ig) G (1 h, 1:200 dilution in buffer A at room temperature) and avidin–biotin–peroxidase complex (1 h, 1:100 dilution in buffer A at room temperature). The tissue-bound peroxidase was developed with H₂O₂, using 3,3-diaminobenzidine as chromogen. To ensure the specificity of the primary antibody, we incubated sections in either the absence of the primary antibody or with a non-immunized rabbit IgG antibody. In these cases, no immunostaining was detected.

2.5. Inhibition of MAPKs by SP600125 and PD98059 or of type IV phosphodiesterase by rolipram in Cer-induced AP

Rats received intraperitoneal (i.p.) injections of SP600125 (15 mg/kg), PD98059 (5 mg/kg), rolipram (5 mg/kg) or their vehicles [1 ml/kg of a 10% DMSO/NaCl solution (SP600125 and rolipram) or 1% Pluronic F-68 in DMSO (PD98059)] both 2 h before and 30 min after (SP600125) [12], 1 h before (PD98059) [29], or 30 min before and 30 min after (rolipram) [30] the first Cer injection. At 2 h, 1 h or 30 min after the first injection of SP600125, PD98059 or rolipram, respectively, the rats were injected subcutaneously with Cer (20 μ g Cer/kg) or its vehicle (0.9% NaCl) at hourly intervals. The animals were sacrificed 2 h after the first Cer injection (early phase of Cer-induced AP).

2.6. White blood cell depletion

Vinblastine sulfate was dissolved in sterile 10 mM sodium phosphate buffer, 147 mM NaCl, and 2.7 mM KCl (pH 7.4) and administered to rats intravenously (i.v.) at a dose of 0.75 mg/kg on day 1, as previously described [31]. At this dose, the animals become neutropenic between days 4 and 6 [31]. On day 5 after vinblastine sulfate or saline administration, the animals were treated with 4 doses of Cer (20 µg Cer/kg, administered at hourly intervals) to induce AP. FK506 and GdCl₃ were dissolved in 1 ml of the same buffer as the vinblastine sulfate. FK506 was administered to rats subcutaneously (0.3 mg/kg body weight) 48 h before the induction of the pancreatitis in 24 h intervals [26]. GdCl₃ (1 mg/100 g of body weight) was injected into the rat tail vein 12 h and 1 h before the start of Cer or saline administration [32].

2.7. Whole and differential white blood cell (WBC) count

Whole WBC and neutrophils were counted from cardiac puncture blood samples by flow cytometry using a Sysmex XT-2000i automated hematology analyzer. Differential WBC counts were done using peripheral blood smears made from drops of blood from the tail vein. The slides were stained using the May–Grünwald–Giemsa method. One hundred cells/blood sample were counted to obtain the leukocyte formula.

2.8. Myeloperoxidase (MPO) assay

MPO activity was detected in the pancreatic postnuclear homogenates immediately after their collection using the Myeloperoxidase Peroxidation Assay Kit and following the manufacturer's instructions.

2.9. Serum AST and ALT determination

Serum levels of AST and ALT were determined with enzymatic assay kits, using a Gernon Star Modular Bio-Chemical analyzer and following the manufacturer's instructions.

2.10. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting

PTPs were analyzed by SDS-PAGE using 10% gels [33]. The proteins present in the gels were transferred to PVDF membranes. After blocking non-specific binding with 5% non-fat dry milk (dissolved in buffer 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5), Western blots were probed with anti-SHP-1, anti-SHP-2 and anti-PTP1B monoclonal antibodies, or anti-GAPDH polyclonal antibodies, diluted 1:150, 1:2500, 1:1000 or 1:40,000, respectively, in the blocking solution. Blots were visualized by chemiluminescence. Analyses of the spots on all the blots were performed as described previously [34]. The densities corresponding to the different PTP bands in the different treatments were normalized to the GAPDH band densities (used as a loading control). The images shown in the figures are from blots whose films were exposed for optimal reproduction rather than for the linearity of band densities.

2.11. ERK, JNK and p38 phosphorylation

Activation of MAP kinases was assessed as previously described [35]. ERK, JNK and p38 kinase activation was evaluated with use of antibodies that recognize dually phosphorylated (Thr/Tyr) MAP kinase, diluted 1:200, 1:1000 and 1:1000, respectively. The blots were stripped and then normalized to total ERK, JNK or p38 kinases with the use of antibodies that recognize the MAP kinases regardless of its phosphorylation state.

2.12. Statistical analysis

Data are expressed as means ± SD. They were analyzed (version 19.0 of the SPSS program for MS Windows, SPSS, Chicago, Ill) using the non-parametric Mann–Whitney *U* test. Statistical significance was considered for a *p* value <0.05.

3. Results

We have previously divided the development of our animal model of AP into the early, intermediate and later (2, 4 and 9 h after the first injection of Cer) phases of AP [14,15]. In this work, serum amylase determination and histological assessment were used for monitoring the establishment of initial and intermediate phases of clinically relevant relatively mild edematous pancreatitis. Similarly to our previously reported data [15,36], as early as 2 h after the first injection of Cer pancreatic acinar cell disruption and some lymphocyte infiltration were observed. A higher degree of leukocyte infiltration, higher numbers of unstructured acini and some neutrophils were detected during the intermediate phase of Cer-induced AP (Supporting Information 1).

3.1. Effect of MAPK inhibitors and rolipram on PTP expression and ERK 1/2 and JNK activation

Figs. 1 and 2 show the expression levels of the very similar SH2-domain containing PTPs SHP-1 and SHP-2, and PTP1B, respectively. They also illustrate the effect on such levels of two different MAPK inhibitors—SP600125 and PD98059 (Fig. 1)—and rolipram, an inhibitor of type IV phosphodiesterase (Fig. 2), during the early phase of Cer-induced AP. In all groups of rats, PTP expression levels (Western blots in whole postnuclear pancreatic homogenates) were quantified (graphics) in two different ways: (1) for an equal amount of proteins (open bars), (2) with respect to the total amount of proteins in the whole pancreas (shaded bars). It is well known that pancreatitis is associated with the neutrophil infiltration and cell death that differentiate the cell composition of the pancreata of the groups of rats. Accordingly, we considered that a better interpretation of the results would require the expression of the data with respect to the total amount of proteins in the pancreas. We have previously reported an increase in the protein levels of the three PTPs during the early phase of Cer-induced AP that may in some way be modulated by MAPK inhibition and the intracellular cAMP pathway [14,15], although the specific MAPK implicated in such modulation is unknown. It is known that such signaling pathways play essential roles in the pathogenesis of AP, in part due to an amelioration of the severity of Cer-induced AP after inhibition of JNK and ERK 1/2 kinases or after increasing cAMP levels in neutrophils [12,30]. In Fig. 1 it can be observed that rather than reducing the increase in the expression of SH2-domain containing PTPs, SP600125 pretreatment significantly increased the expression of both SHP-1 and SHP-2 after Cer administration. With respect to PTP1B, SP600125 pretreatment mostly reduced the increase in its expression after Cer treatment. In Fig. 1 it is also shown that, by contrast, PD98059 pretreatment did not affect the increase in expression of SHP-1 and was able to reduce significantly the increase in SHP-2 expression observed after Cer administration. As in the case of SP600125, PD98059 pretreatment mostly reduced the increase in PTP1B expression after the Cer treatment. In Fig. 2 it can be observed that in comparison with the non-pretreated animals SHP-1 protein expression due to Cer was not modified and SHP-2 protein expression due to Cer was significantly suppressed in the pancreata obtained from Cer-injected rats pretreated with rolipram. With respect to PTP1B, rolipram pretreatment mostly reduced the increase in the PTP protein expression due to Cer.

Once it had been confirmed that the increases in the expression levels of the PTPs due to Cer during the early phase of AP were affected by the signaling pathways studied, we analyzed the activation of ERK 1/2 and JNK in the different groups of rats. Fig. 3 shows that

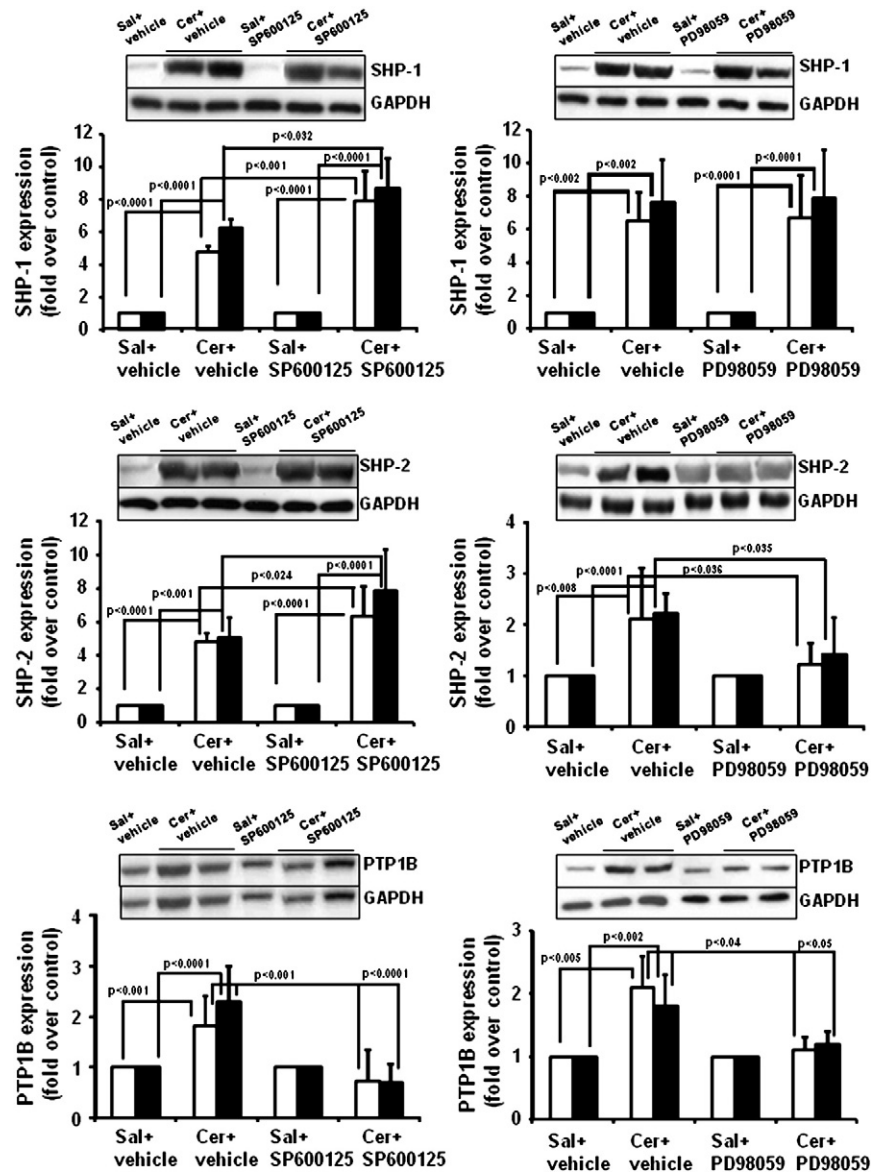


Fig. 1. Effect of MAPK inhibitor pretreatments on SHP-1, SHP-2 and PTP1B protein expression in the early phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with SP600125, PD98059 or its vehicle as indicated in the “Materials and methods” section. Then, the animals were injected subcutaneously with either Cer or its vehicle [20 mg/kg or saline (0.9% NaCl, Sal) in two injections at hourly intervals, respectively]. Quantification (graphics, values given as SHP1/GAPDH, SHP-2/GAPDH and PTP1B/GAPDH ratios, and considering both controls: Sal + vehicle and Sal + inhibitor as 1) of expression (Western blots in whole postnuclear pancreatic homogenates – a representative is shown – where the 2 animals pretreated with the inhibitors are representative of the higher and lower levels of the standard deviation of the experiment) was carried out both per mg of proteins (□) and considering the whole pancreas (■). Each lane in the blots contained 25 µg of proteins. Data are means ± S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

Cer administration led to the increase in the activation of both ERK 1/2 and JNK. Although SP600125 and PD98059 are respectively specific JNK and ERK 1/2 inhibitors, their use in animals may lead to mixed inhibitions of both MAPKs [12]. Accordingly, it was necessary to confirm whether under the conditions used in this study they led to a selective inhibition of one of the MAPKs. As shown in Fig. 3, *in vivo* both inhibitors maintained their selective inhibition. Thus, SP600125 and PD98059 pretreatments led to specific reductions of JNK and ERK1/2 activation, respectively. Although to our knowledge it has never been reported that SP600125 or PD98059 might inhibit p38 MAPK, we also analyzed the activation of this latter kinase in the different groups of rats. As shown in Supporting Information 2, during the early phase of Cer-induced AP the phosphorylation of p38 was not significantly affected, and neither was it affected after SP600125 or PD98059 pretreatments. The lack of response of p38 to Cer is consistent with previously reported data in a similar rat model of AP [29]. Since the phosphorylation of ERK, JNK and p38 determines the activity of MAPK signaling, these data support

the notion that, as expected, p38 does not play a role in the modulation of PTP expression after ERK or JNK inhibition. Therefore, such modulation must be carried by one or both of the two latter MAPKs. With respect to rolipram pretreatment, the activation of the MAPKs did not change with respect to the increase detected after Cer treatment.

3.2. Effect of white blood cell inhibitors on blood cell counts

The development of inflammation and cell death in pancreatitis is somehow influenced by neutrophil infiltration. Additionally, the pancreas probably contains an unknown proportion of resident macrophages, whose activity, as well as that of liver Kupffer cells should be blocked by GdCl₃ [23]. Nevertheless, the effects of GdCl₃ on resident macrophages in the pancreas remain unknown. It is also known that lymphocytes are involved in AP since the calcineurin antagonist FK506 reduces the severity of the disease [23]. In some cases, rats were rendered neutropenic with vinblastine sulfate before treatment with

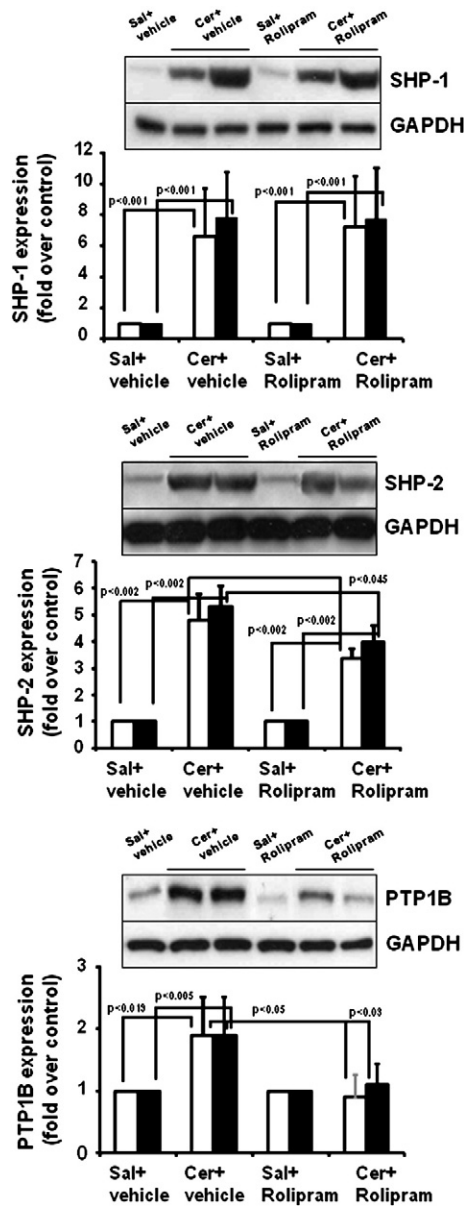


Fig. 2. Effect of PDE4 inhibitor pretreatment on SHP-1, SHP-2 and PTP1B protein expression in the early phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with rolipram or its vehicle as indicated in the “Materials and methods” section. Then, the animals were injected subcutaneously with either Cer or its vehicle [20 mg/kg or saline (0.9% NaCl, Sal) in two injections at hourly intervals, respectively]. Quantification of expression was carried out as indicated in the legend of Fig. 1. Each lane in the blots contained 25 μ g of proteins. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

GdCl₃ or FK506. For this purpose, we chose conditions previously described by us and others [14,15,31]. A count of the cells in the blood of the rats used in our experiments is shown in Supporting Information 3. As expected, a differential leukocyte count in the blood revealed a significant decrease in the percentage of neutrophils only in the groups pretreated with vinblastine sulfate (Supporting Information 4).

3.3. Effect of MAPK inhibitors, rolipram and white blood cell inhibitors on serum amylase, edema and pancreatic MPO levels

Figs. 4 and 5 illustrate the levels of serum amylase in all groups. PD98059 was not able to reduce, SP600125 showed a tendency (although not significant) to reduce, and rolipram significantly reduced the serum amylase activity observed in the animals given Cer alone (2 h after the first injection of Cer). Regarding white blood cell

inhibitors, we decided to study the intermediate phase of AP (4 h) because it has been reported that inflammatory cell infiltration has already taken place at this time [37]. In this case, only the group of rats pretreated with vinblastine sulfate and then treated with GdCl₃ showed a significant reduction in serum amylase activity with respect to the animals given Cer alone. Therefore, the lack of effect of GdCl₃ itself on serum amylase activity differs from previously reported data [32].

Supporting Information 5 shows that Cer treatments also resulted in significant organ edema, as evidenced by the increased pancreatic wet weight. Regarding the MAPK inhibitors, pretreatments with SP600125 and PD98059 were associated with an 80 and 57% reduction in the Cer-induced edema, respectively, which supports the notion of an early protective effect of MAPK inhibition on intrapancreatic damage. By contrast, rolipram pretreatment did not reduce the extent of the edema during the early phase of Cer-induced AP, although such a protective effect has been reported in fully developed Cer-induced AP [30]. This is probably due to the fact that neutrophil infiltration is still low during this early phase (2 h after the first Cer injection).

Leukocyte accumulation in the pancreas was investigated by measuring MPO activity (4 h after the first injection of Cer). In Fig. 5 it may be seen that while Cer treatment caused leukocyte accumulation in the pancreas, the groups of rats that were pretreated with vinblastine sulfate had blunted pancreatic MPO levels. Unlike previously reported data [32], GdCl₃ also significantly decreased pancreatic MPO activity, although the decrease was much more pronounced in the group of rats pretreated with vinblastine sulfate.

3.4. Effect of white blood cell inhibitors on hepatic functions

No significant changes were found on the hepatic functions of GdCl₃- or FK506-treated animals measured as serum values of ALT and AST (Supporting Information 6).

3.5. Effect of white blood cell inhibitors on PTP expression

We have previously reported that the early increase in the expression of both SHP-1 and PTP1B (2 h after the first injection of Cer) persists during the intermediate phase of AP (4 h after the first injection of Cer), although to a lower extent. By contrast, SHP-2 expression falls to levels similar to those of the controls from 4 h onwards [14,15]. Fig. 6 shows that GdCl₃ alone did not significantly affect the changes in protein expression of any of the PTPs after Cer treatment. Nevertheless, the depletion of neutrophils in the rats (rats pretreated with vinblastine sulfate) specifically increased SHP-2 protein expression during the intermediate phase of AP to a significant extent. Also, FK506 alone did not significantly affect the changes in protein expression of any of the PTPs after Cer treatment. In this case, pretreatment with vinblastine sulfate was specifically associated with the decrease in PTP1B expression to levels similar to those of the controls. Since this might indicate that the increase in PTP1B expression due to Cer could occur mainly in leukocytes associated with the inflammatory infiltrate of the pancreas rather than with the acinar cells, immunohistochemical analyses were performed. Supporting Information 7 shows the increase in PTP1B immunoreactivity during the early and intermediate phases of Cer-induced AP; this can be mainly ascribed to the acinar cells and not to the infiltration. The data support a kind of crosstalk between infiltration and acinar cells that needs to be addressed in the future.

4. Discussion

It seems clear that one of the important factors in the development of AP must be the differential change in gene and/or protein expressions in the pancreas during the initial phase of the disease [1]. Such changes might transfer the early activated signaling pathways in pancreatic acinar cells towards final responses even in extrapancreatic tissues. The

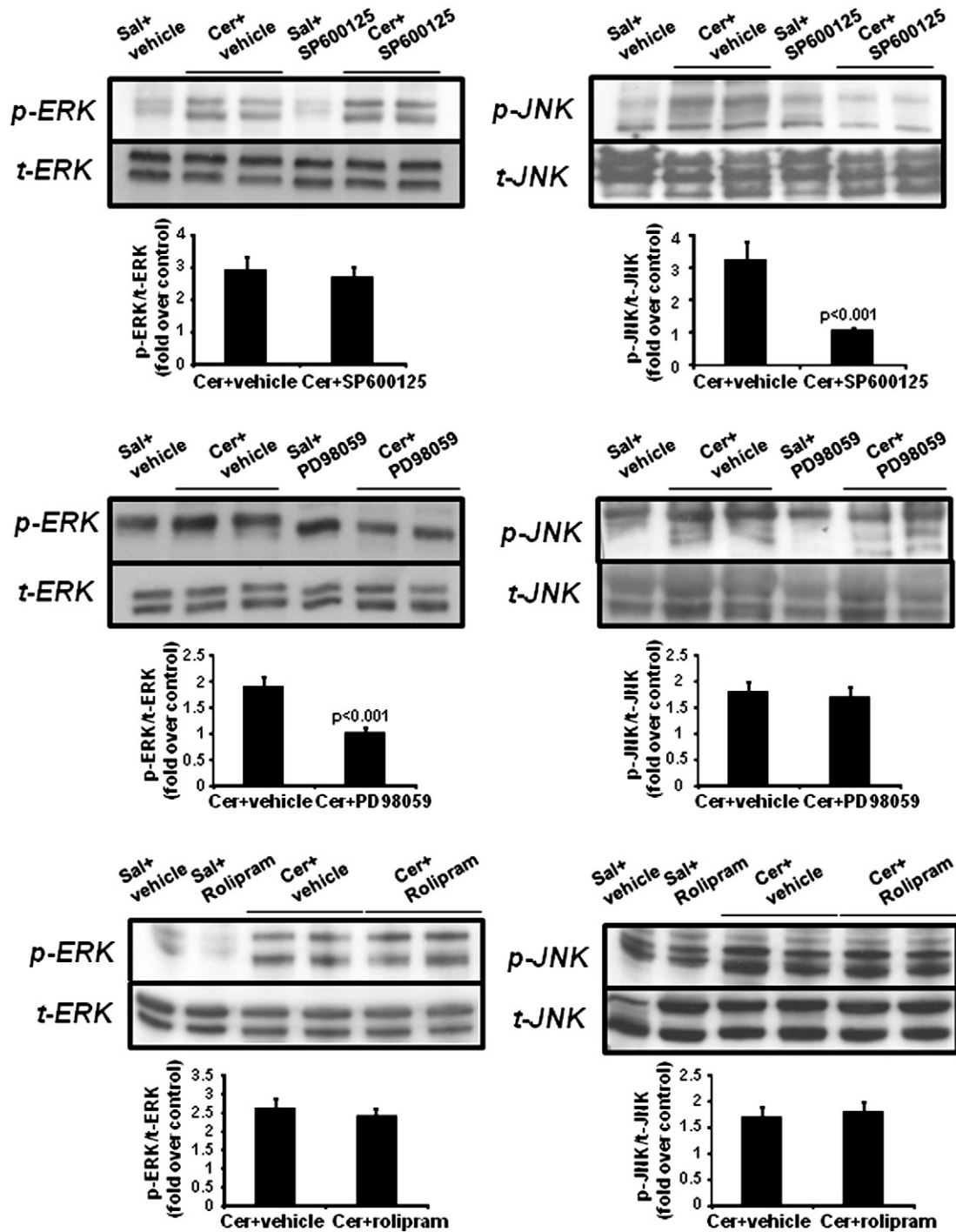


Fig. 3. MAPK activation state in control (Sal) or pancreatic (Cer, early phase of Cer-induced AP) rats pretreated or non-pretreated with MAPKs or PDE4 inhibitors. Activation of signaling cascades was analyzed by immunoblotting with antibodies that recognized the phosphorylated/active forms of ERK and JNK. The same membranes were stripped and reprobed to check the total levels of these proteins. The levels of the phosphorylated/active forms were quantified and normalized with respect to the total levels of these proteins (graphics). Each lane in the blots contained 20 μ g of proteins. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

activation of the stress kinases JNK and ERK1/2 plays an important mediating role during the early phase (first 1–1.5 h) of AP [12,31,38], and might regulate transcription factors (TFs) induced early on during the onset of AP [1], as well as protein translation [39]. Regarding this, we have previously reported an increase in SHP-1, SHP-2 and PTP1B in the pancreas at the level of both protein and mRNA as an early event during the development of Cer-induced AP [14,15]. The fact that out of these three PTPs SHP-2 also increased its protein expression in *in vivo* models of AP brought about by sodium-taurocholate duct infusion and in bile-pancreatic duct obstruction highlights the probable general

importance of this PTP in AP [14,15]. We have also reported that the ERK 1/2 and/or JNK kinases, cAMP levels, and general infiltration of the pancreas modulate the protein expression of all or some of the PTPs in the early phase of Cer-induced AP [14,15]. Nevertheless, the specific MAPK involved in each case, as well as the influence of different types of leukocytes is unknown.

The study of the MAPK involved in PTP protein modulation was accomplished using different inhibitors: SP600125, a JNK inhibitor, and PD98059, an ERK 1/2 inhibitor. It should be noted that although these molecules are specific inhibitors of one type of MAPK, their use in

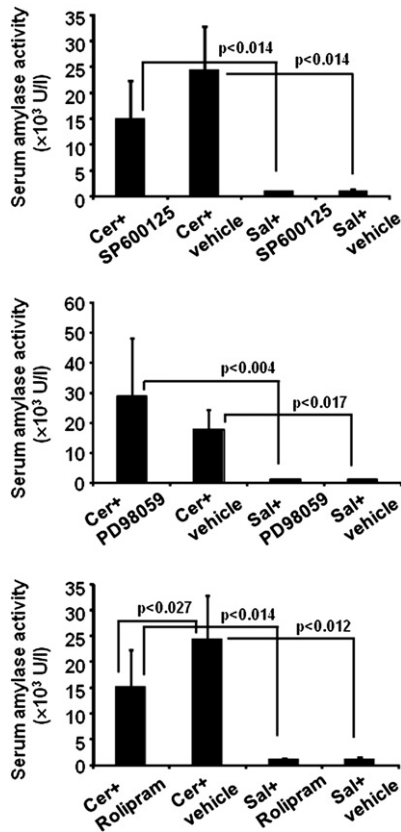


Fig. 4. Effect of MAPKs and PDE4 inhibitor pretreatments on serum amylase activity in the early phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with SP600125, PD98059 or rolipram as indicated in the “Materials and methods” section. Then, the animals were injected subcutaneously with either Cer or its vehicle [20 mg/kg or saline (0.9% NaCl, Sal) in two injections at hourly intervals, respectively]. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

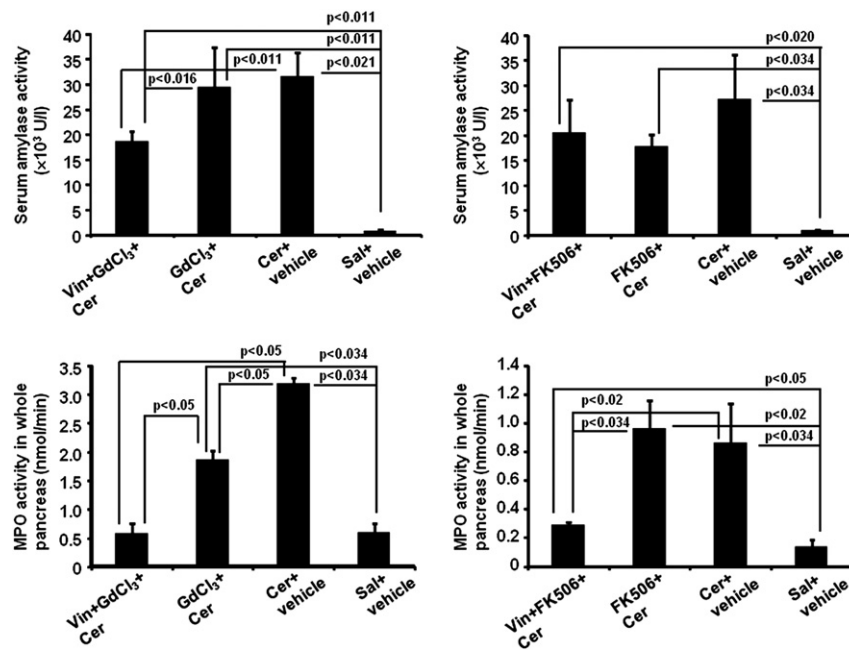


Fig. 5. Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on serum amylase and pancreatic MPO levels in the intermediate phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with GdCl₃, FK506 or their vehicles as indicated in the “Materials and methods” section. Then, the animals were injected subcutaneously with either Cer or its vehicle [20 mg/kg or saline (0.9% NaCl, Sal) in four injections at hourly intervals, respectively]. One group of rats (Vin) was given 0.75 mg/kg i.v. vinblastine sulfate to induce neutropenia before pretreatments with GdCl₃ or FK506 as indicated in the “Materials and methods” section. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

animals might elicit mixed inhibitions of both MAPKs [12]. Accordingly, analysis of the activation state of the kinases after treatment with the inhibitors was necessary to clearly ascribe the modulation of a particular PTP to a specific MAPK. Such an analysis was also performed for rolipram, a specific strong inhibitor of type IV phosphodiesterase. Under the conditions used in this work, SP600125 and PD98059 respectively almost completely inhibited the activation of Cer-induced pancreatic JNK and ERK 1/2, the only two MAPKs that became activated after Cer treatment. Rolipram pretreatment did not affect the MAPK activation state. These results led us to conclude that in the early phase of Cer-induced AP: (i) JNK would be acting by preventing SHP-1 protein expression from increasing beyond a certain level, because the further increase in SHP-1 expression with respect to that observed after Cer treatment occurred only after SP600125, but not after PD98059 pretreatment. Moreover, ERK 1/2 does not seem to be involved in the increase in SHP-1 protein expression due to Cer. (ii) ERK 1/2 was the main MAPK involved in the increase in SHP-2 protein expression due to Cer, because such an effect was blunted only after PD98059 pretreatment. For this PTP, JNK seems to play a role similar to the one describe for SHP-1. In light of the above, JNK seems to negatively modulate the SH2-domain containing PTPs. (iii) Both MAPKs seem to play a coordinated role in the increase in PTP1B protein expression due to Cer, because such an effect was equally blunted after SP600125 or PD98059 pretreatments. These roles of JNK are interesting also in relation to our recent observation that STRAP, an inhibitor of transforming growth factor β (TGF- β), that acts as a negative regulator of the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-1)-mediated JNK signaling cascade, is overexpressed during the early phase of Cer-induced AP [35]. (iv) The experiments with rolipram were done for comparison and as an internal quality control of our results. The results concerning SHP-1 and PTP1B coincided with those previously reported by us [14,15]. The SHP-2 results were partly different because, here, the suppression of the increase in SHP-2 protein expression due to Cer in rolipram-pretreated rats, although significant, was much lower than in our previous experiments [14]. It is known that MAPKs [12] and the increases in intracellular

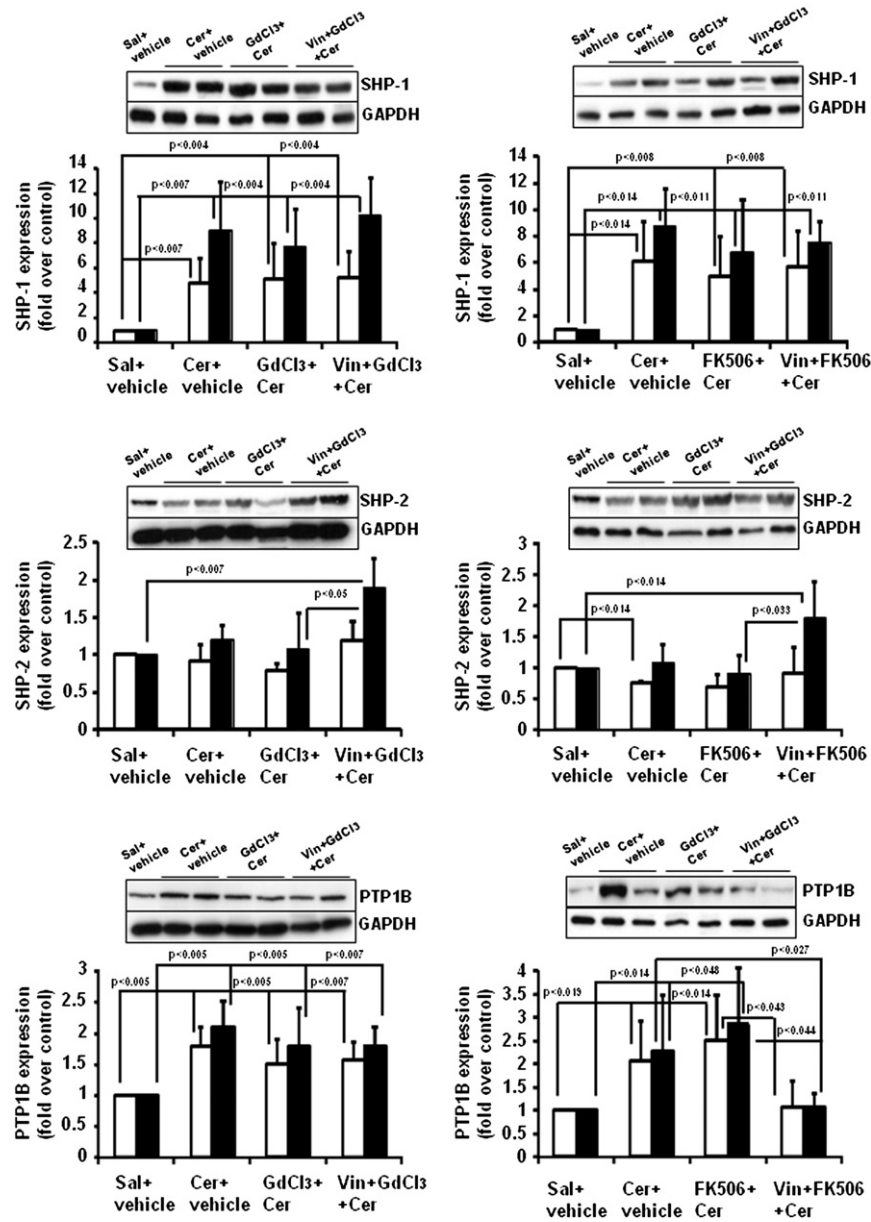


Fig. 6. Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on SHP-1, SHP-2 and PTP1B protein expression in the intermediate phase of Cer-induced AP. Rats were pretreated with vinblastine sulfate, GdCl₃, FK506 or their vehicles as indicated in the legend of Fig. 5. Quantification (graphics, values given as SHP1/GAPDH, SHP-2/GAPDH and PTP1B/GAPDH ratios) of expression (Western blots in whole postnuclear pancreatic homogenates – a representative is shown) was carried out both per mg of proteins (□) and considering the whole pancreas (■). Each lane in the blots contained 25 µg of proteins. Data are means ± S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

cAMP levels [40] either up-regulate or reduce the expression of inflammatory cytokines, such as TNF-α, that prime cell infiltration in the pancreas, respectively. Also, the identification of a pool of a soluble adenylyl cyclase associated with isolated nuclei in unstimulated pancreatic acinar cells, raises the possibility of the implication of this cyclase, and of a compartmentalized cAMP signal, in transcriptional responses [41].

It is known that neutrophil depletion due to an antineutrophil serum or vinblastine sulfate administration reduces the severity of AP because neutrophil infiltration into tissues plays an important role in its development. However, the protection remains partial, perhaps reflecting the presence of local pancreatic macrophages [32]. GdCl₃, a compound that is not toxic at the dose use in this work [23,42], has been employed to inactivate Kupffer cells [32], the resident macrophages in the liver, although it is also possible that gadolinium might have effects on resident macrophages in the pancreas [23]. Kupffer cells are regarded as the predominant source of inflammatory cytokines producing systemic injury

in AP [43]. Also, activated lymphocytes, especially T lymphocytes, probably play a role in the development of AP [23], although a less important one than that of neutrophils. Thus, in Cer-induced AP in mice it has been reported that the CD4⁺ T helper subset is a mediator of local tissue injury [44]. FK506, a drug without significant adverse effects on the exocrine pancreas, exerts its action on T-helper lymphocytes after binding to intracellular immunophilins, thus inhibiting calcineurin phosphatase [45]. This phosphatase is involved in the activation of the transcription nuclear factor of activated T cells that modulates the expression of cytokine genes. Nevertheless, the influence of FK506 in AP is not well understood [46,47] because both attenuation and no changes in intrapancreatic damage have been reported, depending on the animal model used for the induction of pancreatitis [47,48].

Our results indicate that GdCl₃ by itself did not modulate the expression of any of the PTP due to Cer. The positive modulation of SHP-2 protein expression observed in the whole pancreas of rats

pretreated with both vinblastine sulfate and $GdCl_3$ should be ascribed to the neutrophil depletion due to vinblastine administration, because we have previously demonstrated that such an effect is already produced in rats pretreated only with vinblastine [14]. Accordingly, no effect of cytokines produced by the resident macrophages of the liver, and probably also by the resident macrophages of the pancreas, seems to be involved in the increase in PTP protein expression due to Cer. With respect to FK506, similar conclusions to those observed for $GdCl_3$ can be drawn for the SH2-domain containing phosphatases: (i) FK506 alone did not modulate their expression due to Cer, and (ii) the changes observed in SHP-2 protein expression in the Vin + FK506 + Cer group of rats should be ascribed to the neutrophil depletion due to vinblastine [14]. Regarding PTP1B, the increase in the expression of PTP1B protein due to Cer was blunted in the Vin + FK506 + Cer group of rats. This effect should also be ascribed to the neutropenic state, because it was not observed in the FK506 + Cer group (this work) whereas it was in our previous work using rats pretreated only with vinblastine [15]. These data indicate a role of neutrophil infiltration as a regulator of PTP1B protein expression and are in good agreement with those for rolipram, because type 4 phosphodiesterase is abundantly expressed in neutrophils. Accordingly, rolipram will target at least neutrophils, probably exerting anti-inflammatory effects through the inhibition of diverse leukocyte functions such as the production/secretion of proinflammatory cytokines, as indicated above. The data are also in accordance with previous work reporting that rolipram suppressed neutrophil infiltration in the pancreas due to Cer [13].

Concerning serum amylase activity, the lack of an effect of MAPK inhibitors and rolipram on its increase due to Cer is coincident with previously reported data [14,15]. By contrast, in fully developed Cer-induced AP it has been reported that SP600125 significantly reduces the increase in serum amylase activity due to Cer [12]. Taken together, the data support the notion that the reduction in amylase activity after MAPK inhibition would not occur during the early phase of AP but later in its development, as indicated elsewhere [14,15]. $GdCl_3$ and FK506 alone did not decrease serum amylase activity. The lack of effect of FK506 regarding the decrease in serum amylase activity due to Cer has been also reported in a rat model of fully developed Cer-induced AP [26]. By contrast, in a mice model of fully developed Cer-induced AP the prevention of Kupffer cell activation by $GdCl_3$ significantly reduced the increase in serum amylase activity due to Cer [32]. Accordingly, a reduction in such activity would probably also occur later in the development of AP. Neutrophil infiltration (assessed by MPO activity) was already observed during the intermediate phase of Cer-induced AP, as previously reported [14,15]. Since $GdCl_3$ is specifically taken up by Kupffer cells [32], the fact that $GdCl_3$ alone reduced MPO activity probably reflects the presence of local pancreatic macrophages. MPO activity was completely reduced to the control level when $GdCl_3$ treatment was associated with a neutropenic state. The fact that FK506 treatment also associated to a neutropenic state reduced MPO activity almost completely, although not totally, further supports the notion that the residual MPO activity might reflect the existence of macrophages in the pancreas.

In sum, here we unmask the particular MAPK that underlies the modulation of the expression levels of SHP-1, SHP-2 and PTP1B in the early phase of Cer-induced AP development. JNK did not allow SHP-1 protein expression to increase beyond a certain level. ERK 1/2 was the main MAPK involved in the increase in SHP-2 protein expression due to Cer, but was not involved in the increase in SHP-1 protein expression. JNK negatively modulated the SH2-domain containing PTPs. Both MAPKs played a coordinated role in the increase in PTP1B protein expression due to Cer. Finally, neither macrophage activity nor T-lymphocytes modulated the expression of any of the PTPs, although neutrophil infiltration was a regulator of SHP-2 and PTP1B protein expression due to Cer.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.003>.

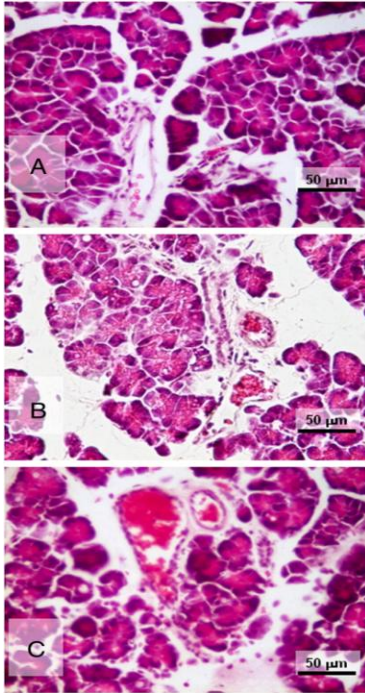
Acknowledgements

This work was supported by Spanish grants PI09/1075 [FEDER—FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias)], SA005A10-2 (Junta de Castilla y León) and Biomedicina, BIO 103/SA39/11 (Junta de Castilla y León). V. García-Hernández was a recipient of a Spanish predoctoral fellowship from MEC. N. Sarmiento was a recipient of a predoctoral fellowship from Banco Santander. L. Matellán was a recipient of a collaboration fellowship from MEC. We also thank J. Hueso (Hospital Fundación Santísima Trinidad, Salamanca, Spain) and A. Mangas (Department of Cell Biology and Pathology, University of Salamanca) for their help with the amylase determinations and the immunohistochemistry, respectively.

References

- [1] B. Ji, X. Chen, D.E. Misek, R. Kuick, S. Hanash, S. Ernst, R. Najarian, C.D. Logsdon, Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator, *Physiol. Genomics* 14 (2003) 59–72.
- [2] R. Alonso, A. Montero, M. Arévalo, L.J. García, C. Sánchez-Vicente, F. Rodríguez-Nodal, J.M. López-Novoa, J.J. Calvo, Platelet-activating factor mediates pancreatic function derangement in cerulein-induced pancreatitis in rats, *Clin. Sci.* 87 (1994) 85–90.
- [3] R. Pescador, M.A. Manso, A.J. Revollo, I. De Dios, Effect of chronic administration of hydrocortisone on the induction and evolution of acute pancreatitis induced by cerulein, *Pancreas* 11 (1995) 165–172.
- [4] N. Yönetçi, N. Oruç, A.O. Özütemiz, H.A. Celik, G. Yüce, Effects of mast-cell stabilization in cerulein-induced acute pancreatitis in rats, *Int. J. Pancreatol.* 29 (2001) 163–171.
- [5] M. Zhao, D.B. Xue, B. Zheng, W.H. Zhang, S.H. Pan, B. Sun, Induction of apoptosis by artemisin relieving the severity of inflammation in cerulein-induced acute pancreatitis, *World J. Gastroenterol.* 14 (2007) 5612–5617.
- [6] N. Rivard, G. Rydzewska, J.-S. Lods, J. Martinez, J. Morisset, Pancreas growth, tyrosine kinase, PtdIns 3-kinase, and PLD involve high-affinity CCK-receptor occupation, *Am. J. Physiol.* 266 (1994) G62–G70.
- [7] N. Rivard, G. Rydzewska, J.S. Lods, J. Morisset, Novel model of integration of signaling pathways in rat pancreatic acinar cells, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) G352–G362.
- [8] T. Muller, A. Choidas, E. Reichmann, A. Ullrich, Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10173–10183.
- [9] J. Schnekenburger, J. Mayerle, B. Krüger, I. Buchwalow, F.U. Weiss, E. Albrecht, V.E. Samoilova, W. Domschke, M.M. Lerch, Protein tyrosine phosphatase κ and SHP-1 are involved in the regulation of cell–cell contacts at adherent junctions in the exocrine pancreas, *Gut* 54 (2005) 1445–1455.
- [10] M.M. Lerch, M.P. Lutz, H. Weidenbach, F. Muller-Pillasch, T.M. Gress, J. Leser, G. Adler, Dissociation and reassembly of adherent junctions during experimental acute pancreatitis, *Gastroenterology* 113 (1997) 1355–1366.
- [11] C. Widmann, S. Gibson, M.B. Jarpe, G.L. Johnson, Mitogen activated protein kinases: conservation of a three kinase module from yeast to human, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 143–180.
- [12] L. Minutoli, D. Altavilla, H. Marini, M. Passaniti, A. Bitto, P. Seminara, F.S. Venuti, C. Famulari, A. Macri, A. Versaci, F. Squadrito, Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis, *Life Sci.* 75 (2004) 2853–2866.
- [13] A. Satoh, T. Shimosegawa, K. Satoh, H. Ito, Y. Kohno, A. Masamune, M. Fujita, T. Toyota, Activation of A1-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats, *Gastroenterology* 119 (2000) 829–836.
- [14] N. Sarmiento, M.C. Sánchez-Bernal, M. Ayra, N. Pérez, A. Hernández-Hernández, J.J. Calvo, J. Sánchez-Yagüe, Changes in the expression and dynamics of SHP-1 and SHP-2 during cerulein-induced acute pancreatitis in rats, *Biochim. Biophys. Acta* 1782 (2008) 271–279.
- [15] N. Sarmiento, M.C. Sánchez-Bernal, M.N. Pérez-González, J.L. Sardina, A. Mangas, J.J. Calvo, J. Sánchez-Yagüe, Rolipram and SP600125 suppress the early increase in PTP1B expression during cerulein induced pancreatitis in rats, *Pancreas* 39 (2010) 639–645.
- [16] P. Feick, S. Gilhaus, I.R. Blum, F. Hofmann, I. Just, I. Schulz, Inhibition of amylase secretion from differentiated AR4-2J pancreatic acinar cells by an actin cytoskeleton controlled protein tyrosine phosphatase activity, *FEBS Lett.* 451 (1999) 269–274.
- [17] A. Hernández-Hernández, M.N. Garabatos, M.C. Rodríguez, M.L. Vidal, A. López-Revuelta, J.J. Sánchez-Gallego, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe, Structural characteristics of a lipid peroxidation product, trans-2-nonenal, that favour inhibition of membrane associated phosphotyrosine phosphatase activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1726 (2005) 317–325.
- [18] C. Sánchez-Bernal, O.H. García-Morales, C. Domínguez, P. Martín-Gallán, J.J. Calvo, L. Ferreira, N. Pérez-González, Nitric oxide protects against pancreatic subcellular damage in acute pancreatitis, *Pancreas* 28 (2004) e9–e15.
- [19] M. You, Z. Zhao, Positive effects of SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 on epidermal growth factor- and interferon- γ -stimulated activation of STAT transcription factors in HeLa cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 23376–23381.
- [20] C.-K. Qu, Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signalling cellular response, *Biochim. Biophys. Acta* 1592 (2002) 297–301.

- [21] A. Bourdeau, N. Dubé, M.L. Tremblay, Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 203–209.
- [22] M. Sandler, A. Dummer, F.U. Weiss, B. Krüger, T. Wartmann, K. Scharfetter-Kochanek, N. van Rooijen, S.R. Malla, A. Aghdassi, W. Halangk, M.M. Lerch, J. Mayerle, Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice, *Gut* 62 (2013) 430–439.
- [23] A. Vonlaufen, M.V. Apte, B.A. Imhof, J.L. Frossard, The role of inflammatory and perenchymal cells in acute pancreatitis, *J. Pathol.* 213 (2007) 239–248.
- [24] J.L. Frossard, A. Saluja, L. Bhagat, H.S. Lee, M. Bhatia, B. Hofbauer, M.L. Steer, The role of intercellular adhesion molecule I and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury, *Gastroenterology* 116 (1999) 694–701.
- [25] Y. Mikami, K. Takeda, K. Shibuya, H. Qiu-Feng, H. Shimamura, J. Yamauchi, S. Egawa, M. Sunamura, H. Yagi, Y. Endo, S. Matsuno, Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? *Pancreas* 27 (2003) 253–260.
- [26] B.M. Rau, M.C. Krüger, C. Hasel, V. Oliveira, C. Rubie, H.G. Beger, M.K. Schilling, Effects of immunosuppressive and immunostimulative treatment on pancreatic injury and mortality in severe acute experimental pancreatitis, *Pancreas* 33 (2006) 174–182.
- [27] N. Sarmiento, J. Sánchez-Yagüe, P.P. Juanes, N. Pérez, L. Ferreira, V. García-Hernández, A. Mangas, J.J. Calvo, C. Sánchez-Bernal, Changes in the morphology and lability of lysosomal subpopulations in caerulein-induced acute pancreatitis, *Dig. Liver Dis.* 43 (2011) 132–138.
- [28] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [29] W. Namkung, J.S. Yoon, K.H. Kim, M.G. Lee, PAR2 exerts local protection against acute pancreatitis via modulation of MAP kinase and MAP kinase phosphatase signalling, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295 (2008) G886–G894.
- [30] T. Sato, M. Otaka, M. Odashima, S. Kato, M. Jin, N. Konishi, T. Matsuhashi, S. Watanabe, Specific type IV phosphodiesterase inhibitor ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (2006) 339–344.
- [31] A.P. Clemons, D.M. Holstein, A. Galli, C. Saunders, Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059, *Pancreas* 25 (2002) 251–259.
- [32] C.M. Pastor, A. Vonlaufen, F. Georgi, A. Hadengue, P. Morel, J.-L. Frossard, Neutrophil depletion—but not prevention of Kupffer cell activation—decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis, *World J. Gastroenterol.* 28 (2006) 1219–1224.
- [33] A. Hernández-Hernández, M. Llanillo, M.C. Rodríguez, F. Gómez, J. Sánchez-Yagüe, Amphiphilic and hydrophilic nature of sheep and human platelet phosphotyrosine phosphatase forms, *Biochim. Biophys. Acta* 1419 (1999) 195–206.
- [34] A. Hernández-Hernández, M.C. Rodríguez, A. López-Revuelta, J.I. Sánchez-Gallego, V. Shnyrov, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe, Alterations in erythrocyte membrane protein composition in advanced non-small cell lung cancer, *Blood Cells Mol. Dis.* 36 (2006) 355–363.
- [35] J.L. Sardina, G. López-Ruano, L.I. Sánchez-Abarca, J.A. Pérez-Simón, A. Gaztelumendi, C. Trigueros, M. Llanillo, J. Sánchez-Yagüe, A. Hernández-Hernández, p22^{phox}-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation, *Cell Death Differ.* 17 (2010) 1842–1854.
- [36] V. García-Hernández, C. Sánchez-Bernal, N. Sarmiento, Raul A. Viana, L. Ferreira, N. Pérez, J.J. Calvo, J. Sánchez-Yagüe, Proteomic analysis of the soluble and the lysosomal + mitochondrial fractions from rat pancreas: implications for cerulein-induced acute pancreatitis, *Biochim. Biophys. Acta* 1824 (2012) 1058–1067.
- [37] J. Mayerle, J. Schnekenburger, B. Kruger, J. Kellermann, M. Ruthenburger, F.U. Weiss, A. Nalli, W. Domschke, M.M. Lerch, Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats, *Gastroenterology* 129 (2005) 1251–1267.
- [38] T. Hofken, N. Keller, F. Fleischer, B. Goke, A.C. Wagner, Map Kinase Phosphatases (MKP's) are early responsive genes during induction of cerulein hyperstimulation pancreatitis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 680–685.
- [39] J.A. Williams, Intracellular signalling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells, *Annu. Rev. Physiol.* 63 (2001) 77–97.
- [40] J. Semmler, H. Wachtel, S. Endres, The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses tumor necrosis factor- α production by human mononuclear cells, *Int. J. Immunopharmacol.* 15 (1993) 409–413.
- [41] T.R. Kolodziej, C.A. Shugrue, E.C. Thrower, L.R. Levin, J. Buck, F.S. Gorelick, Activation of soluble adenylyl cyclase protects against secretagogue stimulated zymogen activation in rat pancreatic acinar cells, *PLoS One* 7 (7) (2012) e41320.
- [42] B. Gloor, K.E. Todd, J.S. Lane, M.P. Lewis, H.A. Reber, Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice, *J. Gastrointest. Surg.* 2 (1998) 430–435.
- [43] B. Gloor, T.A. Blinman, D.A. Rigberg, K.E. Todd, J.S. Lane, O.J. Hines, H.A. Reber, Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats, *Pancreas* 21 (2000) 414–420.
- [44] A. Demols, O. La Moine, F. Desalle, E. Quertinmont, J.L. Van Laethem, J. Devière, DC4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice, *Gastroenterology* 118 (2000) 582–590.
- [45] F.J. Dumont, FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function, *Curr. Med. Chem.* 7 (2000) 731–748.
- [46] J.M. Mayer, V.J. Laine, A. Gezgin, S. Kolodziej, T.J. Nevalainen, M. Storck, H.G. Beger, Single doses of FK506 and OKT3 reduce severity in early experimental acute pancreatitis, *Eur. J. Surg.* 9 (2000) 734–741.
- [47] C. Liu, K. Dou, C. Dou, J. Liu, Q. Zhao, Anti-inflammatory effects of tacrolimus in a rat model of acute pancreatitis, *Med. Chem.* 6 (2010) 37–43.
- [48] Y. Echigo, K. Inoue, M. Kogire, R. Doi, S. Higashide, S. Sumi, H. Kaji, M. Imamura, Effects of cyclosporine and tacrolimus (FK 506) on acute pancreatitis in mice, *Arch. Surg.* 130 (1995) 64–68.



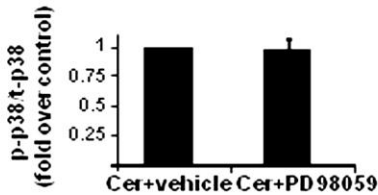
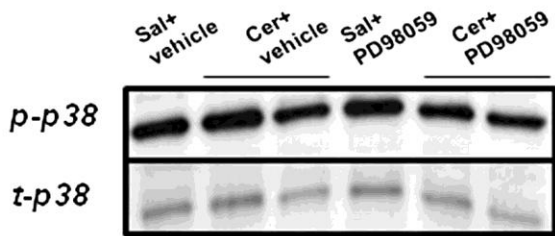
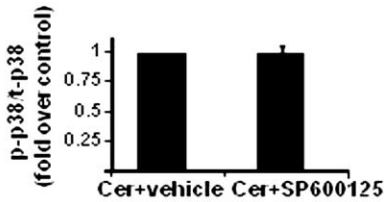
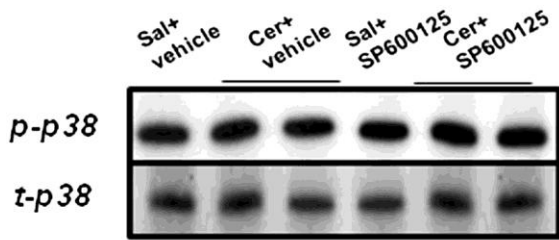
Supporting Information 1 Light microscopy of the rat pancreas stained with hematoxylin & eosin during the early and intermediate phases of cerulein (Cer)-induced acute pancreatitis. Rats were either administered saline (0.9% NaCl) or treated with Cer, ...

Violeta García-Hernández , Nancy Sarmiento , Carmen Sánchez-Bernal , Laura Matellán , José J. Calvo , Jesús Sánche...

Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease Volume 1842, Issue 2 2014 192 - 201

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.003>



Supporting Information 2 p38 activation state in control (Sal) or pancreatic (Cer, early phase of Cer-induced AP) rats pretreated or non-pretreated with ERK or JNK inhibitors. Activation of signaling cascades was analyzed by immunoblotting with antibody...

Violeta García-Hernández , Nancy Sarmiento , Carmen Sánchez-Bernal , Laura Matellán , José J. Calvo , Jesús Sánche...

Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease Volume 1842, Issue 2 2014 192 - 201

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.003>

Supporting Information 3

Table 1
Blood cells count

	Erythrocytes ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	Platelets ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	WBC ($/\mu\text{l}$)	Lymphocytes ($/\mu\text{l}$)
Sal	780.6 \pm 87	803.6 \pm 96 ^a	4875.1 \pm 1622 ^a	4233.3 \pm 1788 ^{a,b}
Cer	841.3 \pm 72	827.7 \pm 158 ^a	5966.7 \pm 1186 ^a	3788.9 \pm 1569 ^{a,b}
GdCl ₃ +Cer	777.0 \pm 57	826.4 \pm 100 ^a	5000.0 \pm 1176 ^a	2350.0 \pm 583 ^a
Vin+GdCl ₃ +Cer	767.31 \pm 63	576.7 \pm 116 ^b	2067.0 \pm 464 ^b	1633,3 \pm 339 ^c
FK506+Cer	872.7 \pm 257	860.6 \pm 176 ^a	5466.7 \pm 1444 ^a	2850.0 \pm 696 ^{a,b}
Vin+FK506+Cer	813.7 \pm 260	876.3 \pm 111 ^a	3033.0 \pm 736 ^b	2566.0 \pm 736 ^{a,b,c}

By files, the results with superscripts without coincident letters (a,b,c): P < 0.05.

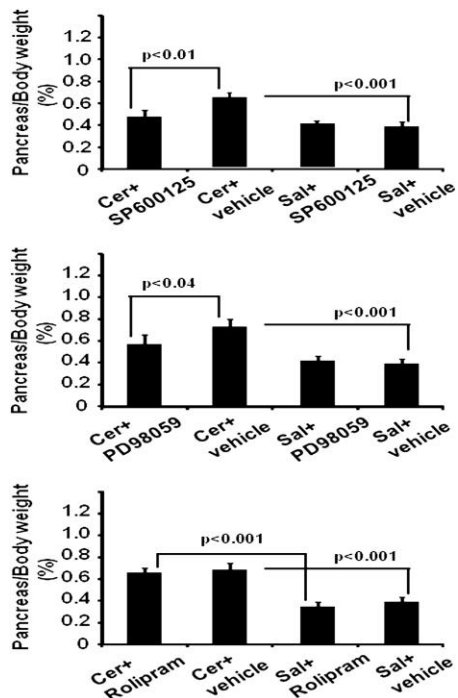
Supporting Information 4

Table 2

Differential White Blood Cell Count

	Lymphocytes	Neutrophils	Monocytes	Eosinophils
Sal	70.0 ± 11.5 ^a	23.3 ± 9.0 ^a	6.4 ± 4.6	0.1 ± 0,3
Cer	44.0 ± 11.9 ^b	47.0 ± 14.6 ^b	8.5 ± 3.7	0.5 ± 0.7
GdCl ₃ +Cer	56.6 ± 19.1 ^{a,b}	38.0 ± 16.9 ^{a,b}	5.0 ± 2.9	0.6 ± 0.8
Vin+GdCl ₃ +Cer	89.5 ± 2.6 ^c	6.3 ± 2.1 ^c	4.0 ± 2.9	0.3 ± 0.5
FK506+Cer	56.9 ± 21.7 ^a	37.8 ± 20.9 ^a	5.4 ± 2.1	0.3 ± 0.5
Vin+FK506+Cer	84.5 ± 3,7 ^c	6.8 ± 1.7 ^c	8.5 ± 3.1	0

By files, the results with superscripts without coincident letters (a,b,c): P < 0.05.



Supporting Information 5 Effect of MAPKs and PDE4 inhibitor pretreatments on pancreatic wet weight. Pancreatic wet weight relative to body weight was measured 2 h after cerulein injection (early phase of Cer-induced AP). Rats were pretreated with the inhib...

Violeta García-Hernández , Nancy Sarmiento , Carmen Sánchez-Bernal , Laura Matellán , José J. Calvo , Jesús Sánche...

Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease Volume 1842, Issue 2 2014 192 - 201

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.003>

5.

Objetivo 6:

Analizar las proteínas solubles y asociadas a membrana cuyos niveles de fosforilación varíen durante la fase temprana de la PA mediada por Cer.

Una vez caracterizados los cambios tempranos que ocurren en el páncreas a nivel de expresión proteica tras el tratamiento con Cer, nos interesó también estudiar en esta fase las alteraciones relacionadas con la fosforilación de proteínas.

La fosforilación proteica es una modificación postraduccional altamente dinámica que desempeña un papel determinante en la regulación de las rutas de señalización celular, afectando a aspectos críticos de la función celular como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, o la actividad del citoesqueleto (Yan y He, 2008). Se estima que aproximadamente un tercio de las proteínas de una célula se fosforilan eventualmente (Hunter, 1998), un proceso que puede alterar su actividad, su localización subcelular o la interacción con otras moléculas (Johnson y Lewis, 2001).

Además, una fosforilación proteica aberrante se ha descrito como causa o consecuencia de múltiples patologías (Cohen, 2001; Lahiry *et al.*, 2010), entre ellas la PA, donde la respuesta inflamatoria característica de la enfermedad parece estar modulada por la acción de quinasas y fosfatasas (Escobar *et al.*, 2012). No obstante, a pesar de las evidencias que señalan a la fosforilación como un proceso con capacidad para modular procesos biológicos y determinante en el desencadenamiento y progresión de la patobiología de la PA, hasta el momento no se han realizado estudios pormenorizados centrados en su fosfoproteoma. Por todo ello, consideramos que la identificación de fosfoproteínas asociadas al desarrollo temprano de la PA puede proporcionar información muy valiosa acerca de los mecanismos patológicos de la enfermedad y asentar un punto de partida útil para el desarrollo de procedimientos diagnósticos y terapéuticos. Para ello, llevamos a cabo un análisis fosfoproteómico de las fracciones subcelulares soluble y de membranas totales del páncreas durante la fase temprana de nuestro modelo de PA mediante dos técnicas proteómicas complementarias: (i) 2-DE con tinción específica de fosfoproteínas seguida de MALDI-TOF MS/MS; (ii) Marcado con TMT⁶ y enriquecimiento de fosfopéptidos seguido de LC-MS/MS.

5.1. Análisis fosfoproteómico de la fracción soluble del páncreas de rata durante la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína mediante 2-DE

En primer lugar, con objeto de detectar proteínas solubles que pudieran presentar fosforilación alterada en las fases iniciales de la PA, decidimos realizar un análisis comparativo mediante 2D-PAGE combinada con un método de tinción fluorescente específico para fosfoproteínas (como se explica en el apartado de Materiales y Métodos).

Únicamente se obtuvieron mapas bidimensionales fosfoproteicos de la fracción soluble, debido a la limitación que la 2-DE supone en la resolución de proteínas de membrana. Las proteínas de membrana, por su alto carácter hidrófobo, son difícilmente detectables mediante el uso de electroforesis bidimensional convencional (Zahedi *et al.*, 2006; Braun *et al.*, 2007). Esta limitación se solventa en gran medida con el uso de técnicas proteómicas basadas la digestión proteolítica de la muestra y el análisis por espectrometría de masas de los péptidos generados (Whitelegge, 2013).

5.1.1. Análisis de la reproducibilidad de la técnica

Antes de llevar a cabo el análisis fosfoproteómico, se determinó la reproducibilidad de la electroforesis bidimensional y la tinción de fosfoproteínas en nuestras condiciones experimentales. Para ello se analizaron tres mapas bidimensionales de una misma muestra control, obtenidos en días diferentes y teñidos con ProQ Diamond (figura 7).

En el análisis de la reproducibilidad se emplearon 386 ± 68 (media \pm D.E.) *spots*. El volumen relativo de cada *spot* en un mapa se comparó con el obtenido en los otros dos mapas, representándose los valores para cada una de las réplicas en los ejes de coordenadas X e Y, respectivamente. La pendiente de la recta de regresión obtenida para cada par de mapas proporcionó el coeficiente de correlación y, por lo tanto, el grado de reproducibilidad de la técnica. Cada punto de la recta de regresión viene dado por el volumen relativo (en porcentaje) que representa cada *spot* reconocido en ambos

geles, de manera que un coeficiente de correlación de valor 1 significa teóricamente que cada especie proteica ocupa el mismo volumen en los dos geles y que, por tanto, se ha enfocado la misma cantidad de ésta en cada punto.

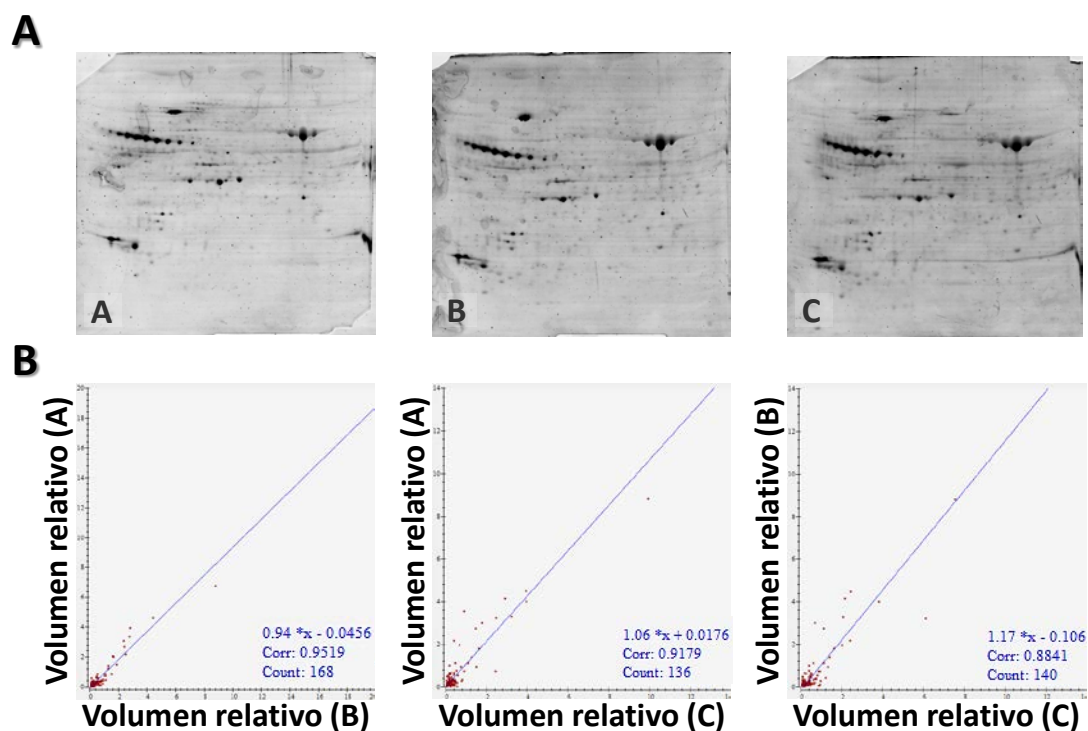


Figura 7. Análisis de la reproducibilidad de la técnica. (A) Tres mapas bidimensionales fosfoproteicos (pI 4-7) de la fracción soluble del páncreas de una rata control. Estos mapas fueron obtenidos en experimentos independientes a partir de una misma muestra de páncreas de rata control **(B) Rectas de regresión y coeficientes de correlación de las tres réplicas empleadas en el análisis de reproducibilidad.** No se muestran las unidades de comparación, puesto que son unidades de cantidad arbitrarias (intensidad x mm²).

En cada una de las gráficas de la figura 7B se expone un ejemplo de la reproducibilidad de la técnica, mostrando las rectas de regresión que se ajustan a los datos del análisis. Como puede observarse, obtuvimos un coeficiente de correlación medio de 0,9180. Podemos decir, por tanto, que la reproducibilidad del método es de un 91,80%, lo que demuestra que es adecuado para llevar a cabo un análisis comparativo.

Se realizaron también estudios similares para evaluar la reproducibilidad de la técnica con tinción de proteínas totales (Sypro Ruby), subsecuente a la tinción de fosfoproteínas, obteniéndose un coeficiente de correlación medio de 0,9234.

5.1.2. Detección e identificación de fosfoproteínas solubles del páncreas con fosforilación alterada en la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína mediante 2-DE

Para detectar posibles alteraciones en el patrón de fosforilación de alguna de las proteínas, se llevó a cabo un análisis comparativo mediante electroforesis bidimensional de geles bidimensionales revelados para la detección de fosfoproteínas. Para ello, se realizaron mapas bidimensionales por duplicado de 5 ratas pertenecientes al grupo control y 6 ratas del grupo pancreatítico, lo que supuso un total de 10 y 12 geles 2D, respectivamente, para cada grupo.

En pruebas previas de isoelectroenfoque con tiras de gradiente de pH 3-10, observamos que la mayor parte de las proteínas se resolvía entre las regiones ácida y neutra del gel (figura 8), por lo que se decidió realizar el IEF en tiras de pH 4-7, a fin de obtener una mejor resolución de las especies proteicas a separar.

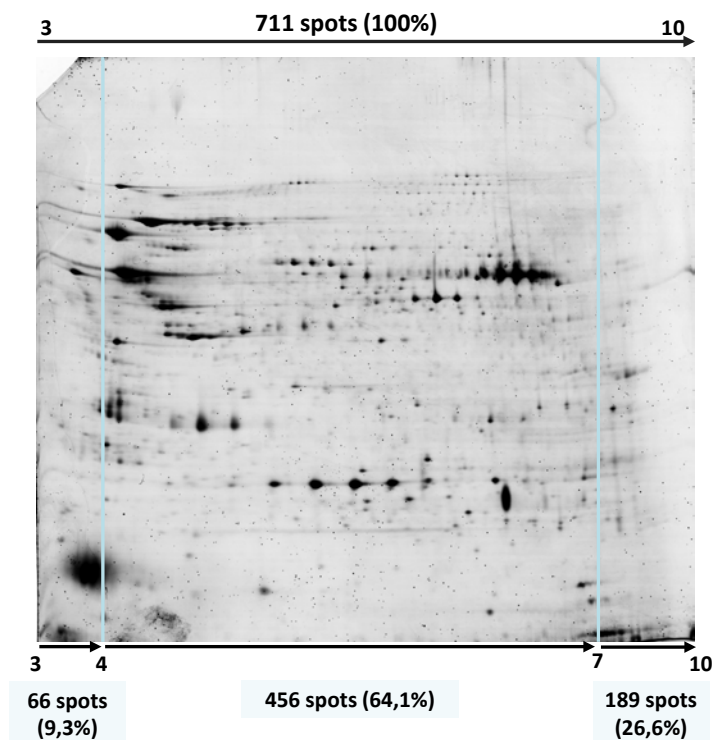


Figura 8. Mapa bidimensional representativo de la fracción soluble (pI 3-10) del páncreas de ratas pancreatítica (Cer, fase temprana). Para la primera dimensión, se empleó una tira de rango de pH de 3-10 (no lineal). Posteriormente, el gel fue revelado con la tinción Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) (para detectar fosfoproteínas) y digitalizado para la detección de los spots proteicos.

Los geles bidimensionales se tiñeron en primer lugar con el reactivo Pro-Q Diamond, específico para la detección de fosfoproteínas y, una vez digitalizados, se continuó con la tinción de SYPRO Ruby para proteínas totales. Tal como se explica en la sección de Materiales y Métodos, este método de tinción dicrómica permite el cálculo del cocientes D/S (el volumen relativo obtenido con la señal de Pro-Q Diamond (D) entre el obtenido para el mismo *spot* con la señal de SYPRO Ruby (S)), aplicado para distinguir fosfoproteínas de proteínas no fosforiladas presentes en abundancia en los geles. En la figura 9 se muestran dos mapas representativos de este estudio, correspondientes a un páncreas control y otro pancreatítico.

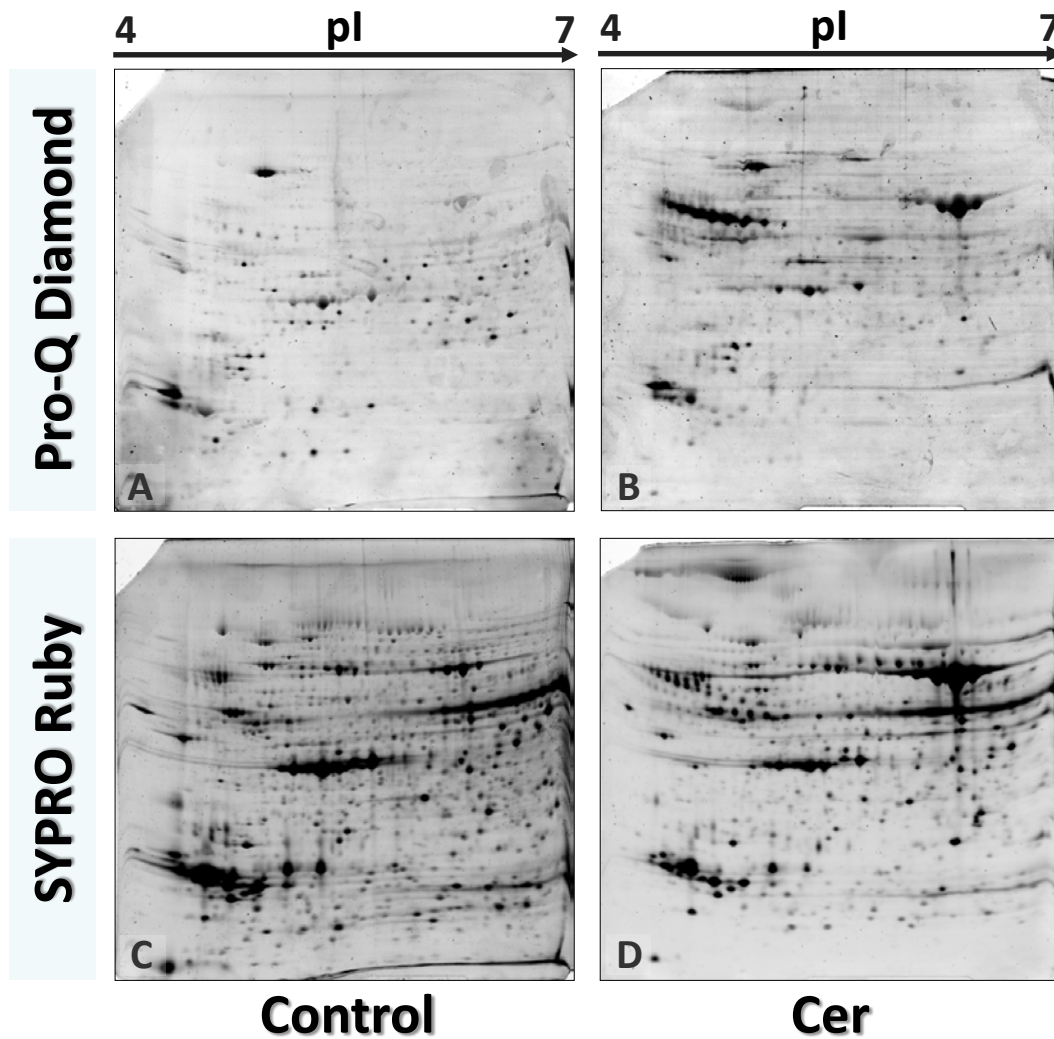


Figura 9. Mapas bidimensionales representativos de la fracción soluble (pI 4-7) del páncreas de ratas control y pancreatítica (Cer, fase temprana). Los geles fueron revelados con la tinción Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) (para detectar fosfoproteínas, geles A y B). Posteriormente, estos geles fueron también revelados con la tinción Sypro Ruby (Invitrogen, Carlsbad, CA) (para detectar proteínas totales, geles C y D).

Las imágenes digitalizadas, se procesaron y analizaron empleando el software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. En la figura 10 podemos observar un ejemplo del resultado del alineamiento de los geles 2D analizados.



Figura 10. Alineamiento de los mapas de fosfoproteínas de la fracción soluble de ratas control y pancreáticas. Se analizaron un total de 12 geles para el grupo pancreático (sección izquierda) y 10 geles en el grupo control (derecha), que se alinearon intra e intergrupalmente. En verde se marcan los *spots* alineados por el programa y en rojo los que no lo son. El primer gel 2D de cada sección corresponde al gel de referencia de su grupo.

En el estudio, la tinción con Pro-Q Diamond detectó 456 ± 90 (media \pm D.E.) *spots* por gel en el caso del grupo control, y 465 ± 66 en el grupo pancreático. Entre ellos, el análisis comparativo detectó 16 *spots* cuya fosforilación variaba significativamente en la fracción soluble entre las muestras control y las pancreáticas. De estas 16 manchas proteicas, 5 aumentan su fosforilación y 1 se fosforila *de novo* en las ratas tratadas con Cer, mientras que 8 disminuyen su fosforilación y 2 se desfosforilan (figura 11 y tabla 6).

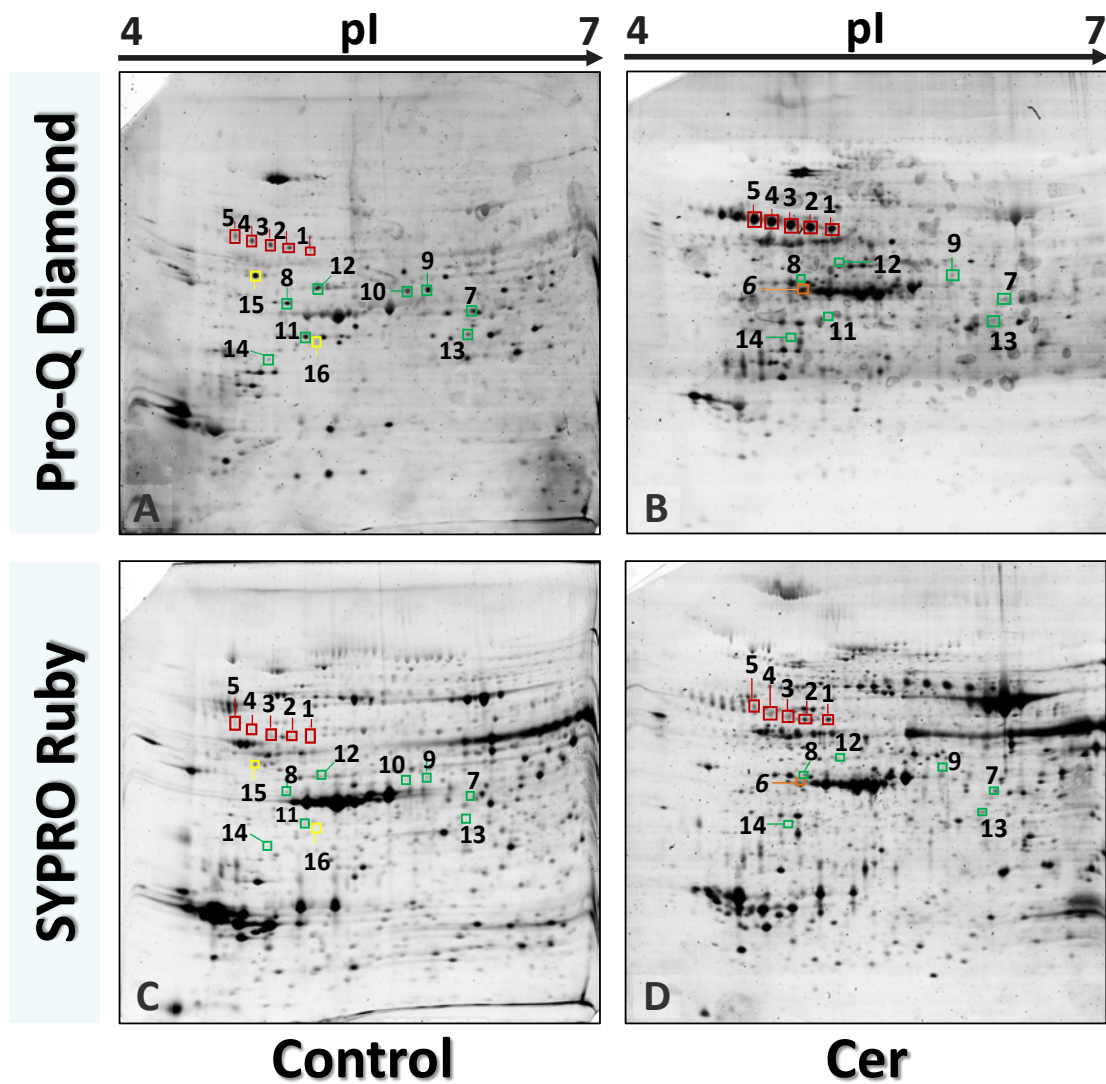


Figura 11. Mapas bidimensionales representativos de la fracción soluble (pI 4-7) del páncreas de ratas control y pancreatítica (Cer, fase temprana). Se muestran los 16 spots cuya variación en volumen relativo entre la fracción soluble del tejido control y pancreatítico resultó estadísticamente significativa. Los 5 spots cuya fosforilación aumenta en los animales pancreatíticos se muestran en rojo, y el spot que se fosforila *de novo* después del tratamiento con Cer se representa en naranja. El color verde representa los 8 spots cuya fosforilación disminuye en el grupo pancreatítico y el color amarillo indica los 2 spots que se desfosforilan en los animales tratados con Cer.

Tabla 6. Proteínas de la fracción soluble del páncreas de rata separadas por 2D-PAGE cuya fosforilación varía significativamente ($p < 0.05$) durante la fase temprana de la pancreatitis aguda.

% volumen ^a (Pro-Q Diamond (D) (Media \pm D.S.))					D/S (Media \pm D.S.) ^b	
Spot	Control (C)	Pancreático (Cer)	Variación (Cer/C)	p-valor ^c	Control (C)	Pancreático (Cer)
1	0,25 \pm 0,06	0,82 \pm 0,13	+3,26	0,001	3,65 \pm 1,01	11,85 \pm 3,81
2	0,31 \pm 0,11	1,64 \pm 0,42	+5,30	9,479e-4	1,30 \pm 0,83	13,63 \pm 4,21
3	0,47 \pm 0,06	3,01 \pm 0,79	+6,48	4,549e-4	5,54 \pm 2,10	24,47 \pm 9,54
4	0,53 \pm 0,17	3,54 \pm 1,08	+6,67	7,386e-4	4,32 \pm 1,62	20,00 \pm 5,85
5	0,61 \pm 0,15	3,39 \pm 0,92	+5,52	0,006	5,63 \pm 0,72	18,84 \pm 5,33
6	-	0,09 \pm 0,01	Aparece	0,020	-	No SYPRO
7	0,70 \pm 0,20	0,20 \pm 0,11	-3,56	5,063e-4	4,11 \pm 1,91	1,05 \pm 0,57
8	0,45 \pm 0,14	0,15 \pm 0,06	-3,07	0,002	9,96 \pm 2,24	0,35 \pm 0,01
9	0,34 \pm 0,08	0,11 \pm 0,07	-3,01	0,013	9,29 \pm 1,26	2,71 \pm 1,32
10	0,24 \pm 0,04	0,06 \pm 0,03	-3,69	0,002	3,29 \pm 0,60	-
11	0,43 \pm 0,06	0,11 \pm 0,06	-3,94	3,670e-5	10,15 \pm 3,11	-
12	0,98 \pm 0,44	0,31 \pm 0,22	-3,16	0,001	8,48 \pm 0,84	1,04 \pm 0,45
13	0,26 \pm 0,05	0,03 \pm 0,01	-9,74	1,336e-5	15,04 \pm 4,17	0,64 \pm 0,31
14	0,13 \pm 0,06	0,02 \pm 0,01	-8,60	1,185e-5	5,62 \pm 1,12	2,33 \pm 0,77
15	0,99 \pm 0,13	-	Desaparece	1,962e-7	12,48 \pm 3,25	-
16	0,04 \pm 0,01	-	Desaparece	4,279e-4	6,06 \pm 0,47	-

a: volumen relativo, calculado como se detalla en Materiales y Métodos.

b: razón Pro-Q Diamond (D)/Sypro RUBY (S).

c: t-Student (test de Kolmogorov-Smirnov n.s.).

d: no existe alineamiento con ningún spot en el gel teñido con Sypro RUBY

Los *spots* proteicos cuyos patrones de fosforilación estaban alterados significativamente, estaban presentes en todas las imágenes analizadas o en todas menos en una de ellas, y contaban con una relación D/S superior a 3 (en el grupo en que el *spot* fuera más abundante), como se refleja en la tabla 6. Así, se seleccionaron para su identificación por MALDI-TOF/TOF MS las 16 especies proteicas cuya fosforilación se encontró alterada en el análisis. La identidad de estas proteínas y su función principal se presentan en la tabla 7. Como podemos observar, las proteínas identificadas por espectrometría de masas resultaron estar fundamentalmente relacionadas con los procesos de transcripción y el funcionamiento del sistema de endomembranas.

En la figura 12 se muestran las regiones ampliadas de los mapas 2D representativas de los cambios de cantidad de fosfoproteína entre el tejido pancreatítico y el control. Como podemos observar, la fetuina A se presenta en diversas isoformas dispuestas en forma de roseta, lo cual es característico de variaciones por modificación postraducciona

Tabla 7. Identificación de proteínas de la fracción soluble del páncreas de rata separadas por 2DPAGE cuya fosforilación varía significativamente ($p < 0.05$) en la fase temprana de la pancreatitis aguda.

Spot ^a	AC ^b	Nombre	Teórico ^c		Experimental ^d		Cer/C (Pro-Q Diamond)	Score	Péptidos (MS, MS/MS)	% ^e cob	Patobiología/Función
			M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI					
1	P24090	Fetuin A (Alpha -2-HS-glycoprotein)	38,76	6,05	62	5,05	+3,26	115	2,1	6	
2	P24090	Fetuin A (AHSG)	38,76	6,05	63	4,97	+5,30	112	3,1	10	
3	P24090	Fetuin A (AHSG)	38,76	6,05	63	4,86	+6,48	127	4,1	19	Respuesta inflamatoria
4	P24090	Fetuin A (AHSG)	38,76	6,05	65	4,77	+6,67	82	2,1	7	
5	P24090	Fetuin A (AHSG)	38,76	6,05	66	4,67	+5,52	108	5,1	15	
6		No identificada					Aparece				
7	P86252	Transcriptional activator protein Pur-alpha	15,37	4,69	42	5,78	-3,56	102	5,1	63	Transcripción
8	O35987	NSFL1 cofactor p47	40,66	5,04	50	4,90	-3,07	289	11, 2	37	Morfogénesis del RE.

Tabla 7. Continuación

Spot ^a	AC ^b	Nombre	Teórico ^c		Experimental ^d		PA/C (Pro-Q Diamond)	Score	Péptidos (MS, MS/MS)	% cob ^e	Patobiología/Función
			M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI					
9	P11960	2-oxoisovalerate dehydrogenase	50,42	7,68	45	5,60	-3,01	180	11, 2	29	Catabolismos de aminoácidos de cadena ramificada
10	P11960	2-oxoisovalerate dehydrogenase	50,42	7,68	45	5,45	-3,69	214	9, 2	24	
11	Q68A21	Transcriptional activator protein Pur-beta	33,51	5,35	37	5,05	-3,94	162	6, 2	29	Transcripción
12	Q63081	Protein disulfide-isomerase A6	48,54	5,00	48	5,02	-3,16	250	5, 2	17	Plegamiento de proteínas
13	P69682	NECAP1	29,79	5,97	37	5,78	-9,80	274	5,2	32	Endocitosis. Transporte proteico.
14	O70593	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein alpha	34,31	5,05	30	4,85	-8,80	98	2, 1	8	Regulación del sistema ubiquitina-proteasoma. Traslocación al RE.
15	Q5M7A4	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	45,38	4,90	50	4,77	Desaparece	251	10, 2	23	SUMOilación. UFMilación.
16	Q5XID1	Anamorsin	33,65	5,30	33	5,08	Desaparece	81	1, 1	5	Apoptosis

a: número asignado a cada spot, tal como aparece en la tabla anterior; b: accession number, código asignado a la proteína en la base de datos UniProtKB; c: M_r y punto isoelectrico teóricos proporcionados por la base de datos NCBI; d: M_r y punto isoelectrico experimentales aproximados, calculados en los geles del grupo experimental en el que el spot fuera más abundante; e: porcentaje de la secuencia de aminoácidos cubierta en la identificación de la proteína.

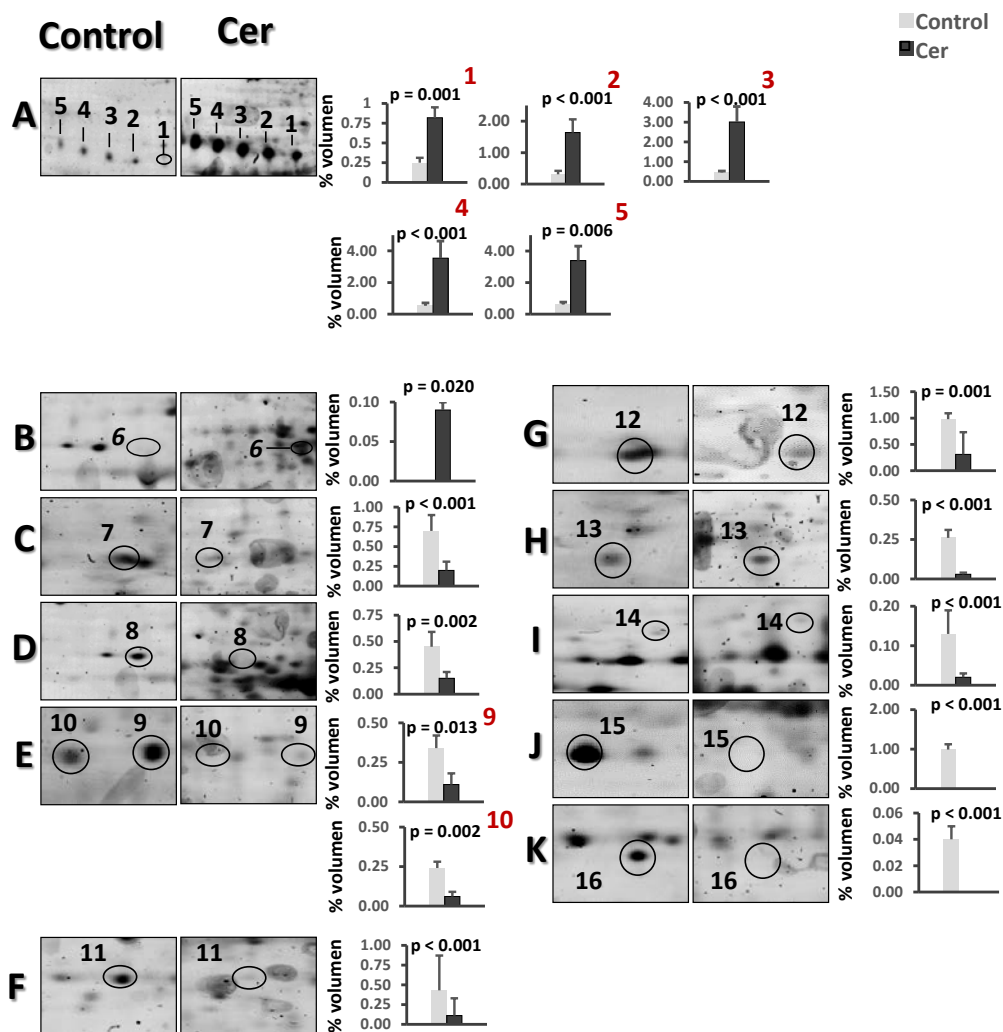


Figura 12. Segmentos de los mapas fosfoproteicos 2D de tejido pancreático procedentes de ratas control y pancreatíticas (fase temprana de la PA mediada por Cer). Las 11 proteínas identificadas se nombraron: (A) Fetuin A (5 spots); (B) Desconocida; (C) Transcriptional activator protein Pur-alpha; (D) NSFL1 cofactor p47; (E) 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha (2 spots); (F) Transcriptional activator protein Pur-beta; (G) Protein disulfide-isomerase A6; (H), NECAP1; (I) Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha; (J) Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5; (K) Anamorsin. El nivel de expresión se muestra en base al volumen relativo.

5.2. Análisis fosfoproteómico de la fracción soluble y de membranas totales del páncreas durante la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína por fosfoproteómica de análisis masivo (*shotgun*)

Para llevar a cabo el análisis fosfoproteómico masivo del páncreas, utilizamos 3 muestras control y 3 muestras pancreáticas, que se analizaron en dos experimentos TMT⁶ plex independientes. Los animales seleccionados para el análisis fueron los mismos que se emplearon en la sección anterior para el análisis de expresión total.

Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina, una vez marcados con marcadores isobáricos TMT⁶, se incubaron en presencia de TiO₂, generando una fracción enriquecida en fosfopéptidos que se analizó por LC-MS/MS. Además, se decidió analizar también la fracción no fosforilada (*flow-through* o fracción no unida a TiO₂) para garantizar que hubiera un conjunto de proteínas de fondo sin regulación diferencial que permitiera garantizar la solidez del tratamiento estadístico de los datos. La información completa en cuanto a la identificación y cuantificación proteómica se encuentra recogida en el material suplementario S2.

El tratamiento con TiO₂ permitió la identificación de un total de 141 y 235 sitios de fosforilación presentes en 127 y 220 fosfopéptidos diferentes (FDR ≤ 1%) de las fracciones fosforiladas soluble y asociada a membranas, respectivamente. Como se muestra en la tabla 8, estos fosfopéptidos derivan de 100 proteínas en el extracto soluble, y 142 en el caso del extracto de membranas totales. La proporción de residuos de serina, treonina y tirosina fosforilados fue de aproximadamente 89,36%, 8,51% y 2,13% para los fosfopéptidos solubles, y de 89,36%, 8,94% y 1,70% para los asociados a membranas (figura 13). Estos valores son similares a los descritos anteriormente en la literatura (Olsen *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2016).

Además, junto con los péptidos fosforilados, en la etapa de enriquecimiento co-eluyen péptidos no fosforilados que, por sus características físicoquímicas, presentan afinidad por la columna de TiO₂. En este, sentido, la relación entre fosfopéptidos y péptidos totales enriquecidos por la resina fue del 83,93% en la fracción soluble y del

77,81% en la fracción de membranas, lo que a nuestro juicio es una tasa de purificación razonable y próxima a la descrita en experimentos similares (Song *et al.*, 2017).

Tabla 8. Resumen de fosfoproteínas. Valores obtenidos en el análisis proteómico de los datos LC-MS/MS de la fracción enriquecida por TiO₂.

	Fosfoproteínas		Fosfopéptidos		Sitios de fosforilación	
	S	M	S	M	S	M
Total	100	142	127	220	141	135
Regulación positiva	10	5	12 ^a	7 ^b	10 ^a	5 ^b
Regulación negativa	5	8	5	9	5	9

S: fracción soluble. M: fracción de membranas totales.

a: el mismo sitio de fosforilación (S129) se detecta en los péptidos ¹²²²EATLPPVSPPK¹²³², S8; ¹²²²EATLPPVSPPKAALAVDEVER¹²⁴², S8; ¹²²²EATLPPVSPPKAALAVDEVERK¹²⁴³, S8 de D3ZU13.

b: el mismo sitio de fosforilación (S51) se detecta en los péptidos ⁴⁹SSSPEPVTHLK⁵⁹, S3 y ⁴⁴SDDSKSSSPEPVTHLK⁵⁹, S8 de D4A6C5; el mismo sitio de fosforilación (T221) se detecta en los péptidos ²⁰²KPLPDHVSIVEPKDEILPTTPISEQK²²⁷, T20 y ²¹⁵DEILPTTPISEQK²²⁷, T7 de P62909.

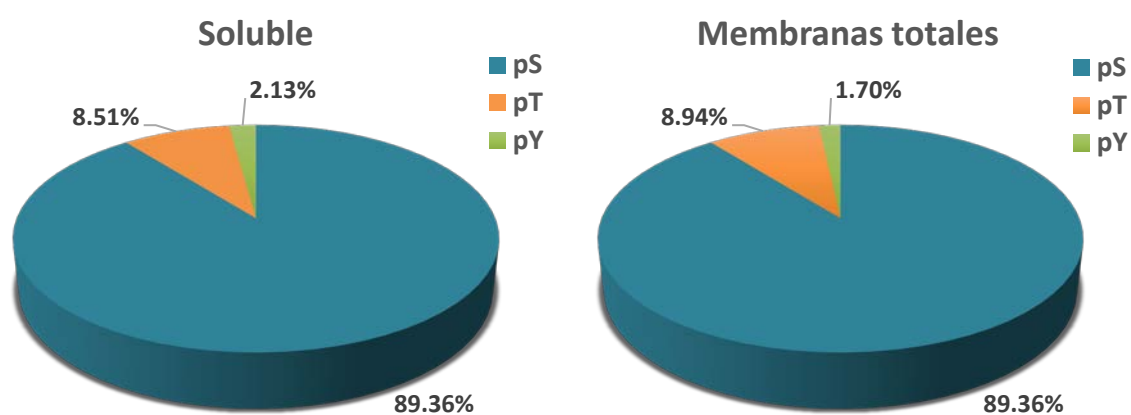


Figura 13. Distribución de sitios de fosforilación en los fosfopéptidos identificados por LC-MS/MS. pS: serina fosforilada; pT: treonina fosforilada; pY: tirosina fosforilada.

De entre todos los fosfopéptidos cuantificados, 15 sitios de fosforilación pertenecientes a 15 proteínas (soluble) y 14 sitios de fosforilación de 13 proteínas (membranas totales) estaban regulados diferencialmente en las ratas pancreáticas respecto a las control ($q < 0.05$). De ellos, el tratamiento con Cer indujo la fosforilación en 12 y 7 casos, mientras que la desfosforilación se observó en 5 y 9 casos, en las muestras soluble y de membranas, respectivamente. No aparecen fosfopéptidos modulados coincidentes entre los dos extractos subcelulares.

En las tablas 9 (fracción soluble) y 10 (fracción de membranas totales) se describen los valores de cuantificación de las fosfoproteínas y fosfospéptidos regulados diferencialmente, así como su principal función biológica.

De nuevo se observa la modulación del sistema endolisosómico y del retículo endoplasmático, de procesos relacionados con el tráfico de proteínas y membranas o la exocitosis, así como de la traducción proteica, que afecta a la fosforilación de proteínas de ambas fracciones subcelulares durante la fase temprana de la PA inducida por Cer. Tales fenómenos se han implicado de forma específica en el inicio de la patología a nivel molecular, y su alteración puede resultar clave para que ésta progrese hacia una forma completa. Por ello, el estudio detallado de los elementos concretos que determinan dicha alteración será fundamental para comprender la patogénesis de la PA.

Algunas de estas proteínas se seleccionaron para profundizar en su estudio mediante inmunotransferencias a partir de geles Phos-tag, incluido en el siguiente apartado.

Tabla 9. Fosfoproteínas de la fracción soluble del páncreas diferencialmente reguladas durante la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por Cer ($q < 0.05$).

AC ^a	Proteína	Secuencia (fosfopéptido), sitio	PA/C	q ^b	Función
D3ZU13	Eif4g1	¹²²² EATLPPV S PPKAALAVDEVER ¹²⁴³ , S1229	5.97	***	Síntesis proteica
		¹²²² EATLPPV S PPK ¹²³² , S1229	2.45	*	
		¹²²² EATLPPV S PPKAALAVDEVER ¹²⁴² , S1229	2.27	*	
P24090	Fetuin A (AHSG)	³⁰⁶ HAFSPVASVESAS S GEVLHSPK ³²⁶ , S318	4.10	***	Respuesta inflamatoria
P47973	Tristetraprolin	¹⁷⁶ QSI S FSGLPSGR ¹⁸⁷ , S179	4.02	**	Respuesta inflamatoria
P22734	Catechol O-metiltransferase	²⁵³ AIYQGP S SPDK ²⁶³ , S260	3.87	*	Metabolismo de catecolaminas
Q91Y81	Septin-2	²¹⁰ IYHLPDAE S DEDEDFKEQTR ²²⁹ , S218	3.52	***	Organización del citoesqueleto
A0A0G2 JUA5	Protein Ahnak	¹³⁴ LR S EDGVEGDLGETQSR ¹⁵⁰ , S135	2.84	**	Transducción de señales intracelulares.
A0A0G2 JVM2	Protein Mia3	¹³⁴⁸ DSLPSGPREEAQ P SPSSVQDR ¹³⁶ , S1362	2.65	*	Transporte anterógrado. Exocitosis
B2GUV7	Eukaryotic translation initiation factor 5B	²⁰⁹ SVPT I DSGNEDDDSSFKIK ²²⁷ , T212	2.25	*	Síntesis proteica
D3ZFH5	Protein Itih2	⁵⁹ SLSE S GEEMDSVDPVTLYSYK ⁸⁰ , S64	2.24	*	Inhibición de serina proteasas
A0A0G2 K8R3	Protein Lmo7	¹⁴⁷⁴ SRST T ELNDPLIEK ¹⁴⁸⁷ , T1478	2.08	*	Organización del citoesqueleto
Q9JJ19	NHE-RF1	²⁸⁵ SASS T SEELNAQDSPK ³⁰¹ , T290	0.52	*	Organización del citoesqueleto. Señalización por AMPc
Q8VHK7	Hepatoma-derived growth factor	¹⁵⁸ AGD M LED S PKRPK ¹⁷⁰ , S165	0.41	**	Proliferación celular

Q5BJN1	Protein Stard10	²⁷⁶ AGGAGEG S DDDTSLT ²⁹⁰ , S284	0.36	*	Transporte de lípidos
B2RYW7	Protein Srp14	⁴³ K S VEGLEPAENK ⁵⁵ , S45	0.35	**	Direccionamiento al RE
P13255	Glycine N-methyltransferase	⁸ TR S LGVAEGIPDQYADGEAAR ²⁹ , S10	0.21	*	Metabolismo de la glicina

a: accession number, código asignado a la proteína en la base de datos UniProtKB.

b: *: q<0.05; **: q<0.01; ***: q<0.001.

Tabla 10. Fosfoproteínas de la fracción de membranas totales del páncreas diferencialmente reguladas durante la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por Cer (q < 0.05).

AC ^a	Proteína	Secuencia (fosfopéptido), sitio	PA/C	q ^b	Patobiología/Función
D4A9T6	Protein Aqp12a	²⁷⁵ VKL S PGSVDTK ²⁸⁵ , S278	13.38	**	Transporte de agua y solutos neutros.
D4A6C5	Protein Arhgap1	⁴⁹ SS S PEPVTHLK ⁵⁹ , S51	7.23	*	Endocitosis. Localización de endosomas.
		⁴⁴ SDDSKSS S PEPVTHLK ⁵⁹ , S51	4.26	*	
P62755	40S ribosomal protein S6	²³³ RL S LRASTSK ²⁴³ , S235, S236	6.44	*	Síntesis proteica.
P62909	40S ribosomal protein S3	²⁰² KPLPDHVSIVEPKDEILPT T PISEQK ²²⁷ , T221	3.65	*	Síntesis proteica.
		²¹⁵ DEILPT T PISEQK ²²⁷ , T221	3.47	*	
Q9JK11	Reticulon-4	⁹² GPLPAAPPAAPERQP S WER ¹¹⁰ , S107	2.87	*	Morfogénesis del RE
P05197	Elongation factor 2	⁵¹ AGETRF T DTR ⁶⁰ , T57	0.35	*	Síntesis proteica
P30009	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	¹³¹ AEDGAAP S PSSETPKK ¹⁴⁶ , S138	0.32	*	Organización del citoesqueleto. Sustrato de la PKC.

Q6PCT3	Tumor protein D54	¹⁷⁴ NSATFKS ¹⁸⁴ FEDR ¹⁸⁴ , S180	0.31	*	Tráfico vesicular. Exocitosis.
F1M062	Protein Larp1	³⁴⁵ QHYQKETE ³⁵⁹ SAPGSPR ³⁵⁹ , S353	0.30	*	Transducción. Síntesis proteica
Q9JID1	Programmed cell death protein 4	⁸⁷ SGVAVPT ⁹⁶ SPK ⁹⁶ , S94	0.29	*	Apoptosis. Regulación de la ruta de JNK.
		⁴⁵⁵ FV ⁴⁶³ SEGDGGR ⁴⁶³ , S457	0.24	*	
Q5XIU9	Pgrmc2	¹⁹⁴ LLKPGEEPSEY ²¹⁷ TDEEDTKDHSKQD ²¹⁷ , T205	0.28	*	Señalización por progesterona. Unión de grupo hemo.
F1MAB9	Protein Tpd52	¹⁹² NSPTFKS ²⁰² FEEK ²⁰² , S198	0.28	*	Tráfico vesicular. Exocitosis.
Q4KLN7	Arfgap3	²³⁸ LTNTS ²⁴⁸ FTEIEK ²⁴⁸ , S	0.11	*	Transporte proteico y vesicular.
<p>a: accession number, código asignado a la proteína en la base de datos UniProtKB.</p> <p>b: *: q<0.05; **: q<0.01; ***: q<0.001.</p>					

5.3. Combinación de estrategias para el análisis fosfoproteómico de la fracción soluble del páncreas durante la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína

En la figura 14 comparamos las dos estrategias descritas en los apartados anteriores, para la detección de fosfoproteínas con estado de fosforilación alterado en nuestro modelo experimental. Como puede observarse, solamente se detecta una fosfoproteína con regulación diferencial mediante ambos métodos: la fetuina A. Examinando estos datos en mayor profundidad, comprobamos que en el análisis *shotgun* no se detectaron péptidos fosforilados de la mayor parte de las fosfoproteínas que se encontraron alteradas en el análisis 2D; con la excepción de NSFL1 cofactor 47 y transaldosa, de las que sí se identifican fosfopéptidos que no aparecen regulados significativamente (Material suplementario S2).

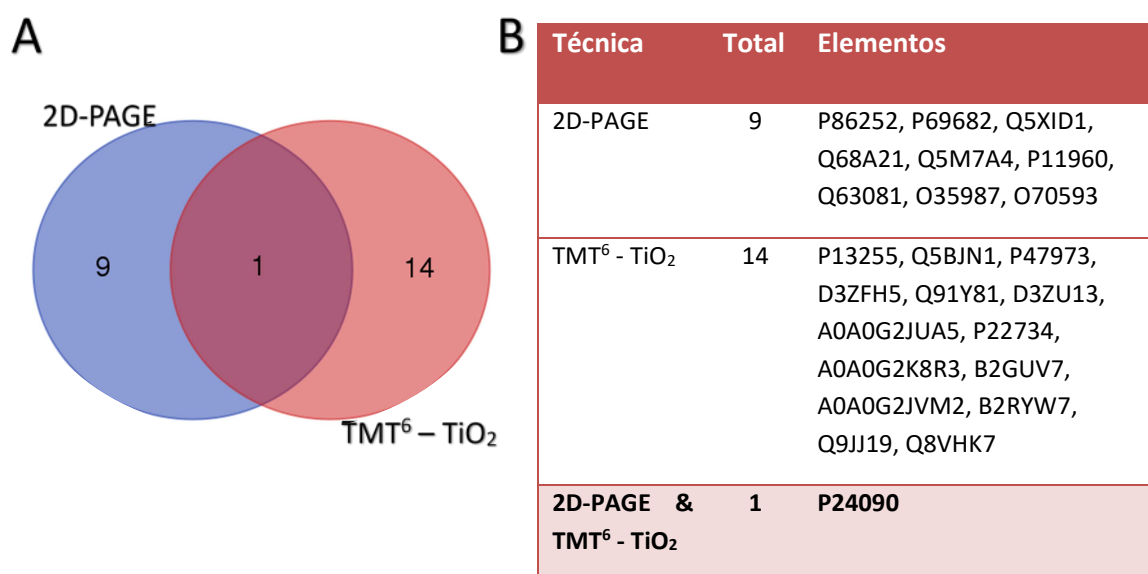


Figura 14. Comparación de estrategias para el análisis fosfoproteómico de la fracción soluble del páncreas durante la fase temprana de la PA inducida por Cer. (A) Diagrama de Venn de las proteínas con fosforilación diferencial detectadas por 2D-PAGE y por TMT⁶ LC-MS/MS, previo enriquecimiento con TiO₂ o por ambos. (B) Accession number (código UniProtKB) de proteínas con fosforilación diferencial detectadas por 2D-PAGE y por TMT⁶ LC-MS/MS, previo enriquecimiento con TiO₂ o por ambos.

La diferente población de proteínas solubles analizada por cada técnica sería una posible explicación a esta divergencia. Así, en los mapas fosfoproteicos bidimensionales se resolvieron proteínas de punto isoeléctrico ácido-neutro (4-7), lo que supone un enriquecimiento en estas especies que facilitaría la detección de diferencias en este rango, que en el caso de la técnica *shotgun*, al analizar la fracción soluble completa quedarían enmascaradas por fosfopéptidos más abundantes. Otra posible explicación radicaría en un hipotético impedimento en la unión TiO₂ – fosfopéptido introducido por el etiquetado con TMT, que se comentará con detalle más adelante.

Por su parte, la fracción de membranas totales se analizó únicamente mediante proteómica *shotgun*, debido a la limitación que la 2-DE supone en la resolución de proteínas de membrana, como se comentó anteriormente.

5.4. Verificación de los datos fosfoproteómicos mediante Phos-tag SDS-PAGE y transferencia de Western

Para confirmar las variaciones de fosforilación obtenidas en ambas fracciones subcelulares, realizamos inmunodetecciones a partir de geles de poliacrilamida Phos-Tag.

El reactivo Phos-TagTM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan), es una molécula de pequeño tamaño que une específicamente iones fosfato, la cual, al incorporarse a los geles SDS-PAGE en presencia de Mn^{2+} o Zn^{2+} , retarda la movilidad electroforética de las especies fosforiladas en comparación con sus equivalentes no fosforiladas, permitiendo incluso la separación de formas con diferente número o posición de grupos fosfato (Kinoshita *et al.*, 2006). Además, para identificar las bandas no fosforiladas, se analizaron muestras correspondientes al grupo experimental en el que cada proteína presentara mayor estado de fosforilación sometidas previamente a tratamiento con fosfatasa alcalina.

Analizamos los cambios en fosforilación de fetuina A y StARD10 en la fracción soluble, y de ARHGAP1, la proteína tumoral D54 y AREGAP3 en la fracción de membranas totales (figuras 15-18). Estos candidatos fueron seleccionados para su verificación en base a su interés biológico en relación a la patología, dentro de la disponibilidad de anticuerpos en el mercado.

Los análisis por inmunotransferencias Phos-tag de las proteínas indicadas confirmaron las alteraciones en los patrones de fosforilación detectadas durante la fase temprana de la PA mediante el estudio proteómico. En las gráficas de las figuras 15-18, los cambios en los niveles de fosforilación se cuantificaron por dos estrategias complementarias: (i) mediante el cociente entre la especie fosforilada con respecto al total de bandas de la misma muestra, comparando esta relación en ratas pancreáticas respecto a las control; (ii) comparando individualmente cada especie de fosforilación o la suma de sus señales- en los animales pancreáticos con las ratas control. Como en anteriores ocasiones, la cuantificación de las bandas proteicas se expresó con respecto a la cantidad total de proteínas en el todo el páncreas. Consideramos que esta es una aproximación más precisa, dada la asociación de la PA con cambios en la composición

celular del tejido, debidos fundamentalmente a la infiltración leucocitaria y a la inducción de la muerte celular.

La primera proteína soluble analizada fue la fetuina A, cuya fosforilación resultó modulada tanto en el análisis de mapas bidimensionales como en los experimentos LC-MS/MS previo marcado y enriquecimiento de fosfopéptidos. Comprobamos que el incremento en la expresión total de fetuina A (confirmado con anterioridad) se acompaña de un aumento de los niveles de fosforilación de la proteína durante el inicio de la pancreatitis experimental. En la figura 15 observamos que la banda única detectada en un Western convencional se divide a su vez en varias manchas proteicas con diferente movilidad electroforética en los geles Phos-tag. Por comparación con el perfil obtenido tras el tratamiento con fosfatasa alcalina, podemos concluir que la banda proteica inferior se corresponde con la forma no fosforilada, mientras que en la región superior del gel se resuelven formas con algún nivel de fosforilación. La cuantificación por densitometría de estas especies demuestra un aumento significativo de la fetuina A fosforilada ($6,51 \pm 1,77$ veces (bandas fosforiladas) y $4,29 \pm 0,69$ veces (razón fosfopetuina A – total) en ratas pancreáticas, $p < 0.05$), pero no de la forma no fosforilada.

La fetuina A es una glicoproteína sérica producida principalmente en el hepatocito, donde la proteína nativa experimenta varias modificaciones post-traduccionales, incluyendo N- y O-glicosilación, procesamiento proteolítico y fosforilación en residuos de serina (Lee *et al.*, 1987; Kellermann *et al.*, 1989). Se acepta que, en mamíferos, la proteína debe fosforilarse para ejercer sus efectos fisiológicos (Auberger *et al.*, 1989; Kalabay *et al.*, 1996; Srinivas *et al.*, 1996; Ohnishi *et al.*, 1997). Haglund, *et al.* (2001) observaron que, en humanos, aproximadamente el 20% de la fetuina A plasmática está fosforilada en dos sitios: la Ser¹²⁰, fosforilación constitutiva; y la Ser³¹², sometida a regulación covalente. Nuestros resultados proteómicos muestran que la fetuina A está fosforilada en al menos dos sitios, correspondientes a la Ser³¹⁶ y la Ser³¹⁸. Dichos residuos se engloban en el mismo péptido tríptico, que adicionalmente se detecta en su versión nativa, pero no aparecen simultáneamente fosforilados. Estos datos concuerdan con el perfil de especies de fosforilación obtenido en geles Phos-tag; sin embargo, difieren de los resultados obtenidos en los geles 2D, donde fetuina A se

identificó como al menos 5 spots con pequeñas desviaciones de su punto isoeléctrico. Este hecho podría explicarse por la combinación de la fosforilación con otro tipo de modificación postraduccional (presumiblemente, variaciones en las cadenas oligosacáridicas) y es semejante a lo referido por Le Cam *et al.*, (1985). De hecho, el análisis de los patrones de glicosilación de esta y otras proteínas sería interesante para completar la caracterización de la proteómica de la fase temprana de la pancreatitis aguda.

La ausencia de modulación de la forma no fosforilada nos resultó especialmente llamativa, pues necesariamente significa que el incremento de expresión total descrito para la proteína es en concreto un incremento de fosfofetuina A. Es decir, que prácticamente toda la proteína que se sobreexpresa pasa a encontrarse en su forma biológicamente activa, lo que apoya la idea propuesta en el capítulo anterior sobre el efecto protector temprano de fetuina A durante la PA experimental, en respuesta a la liberación temprana de citoquinas proinflamatorias.

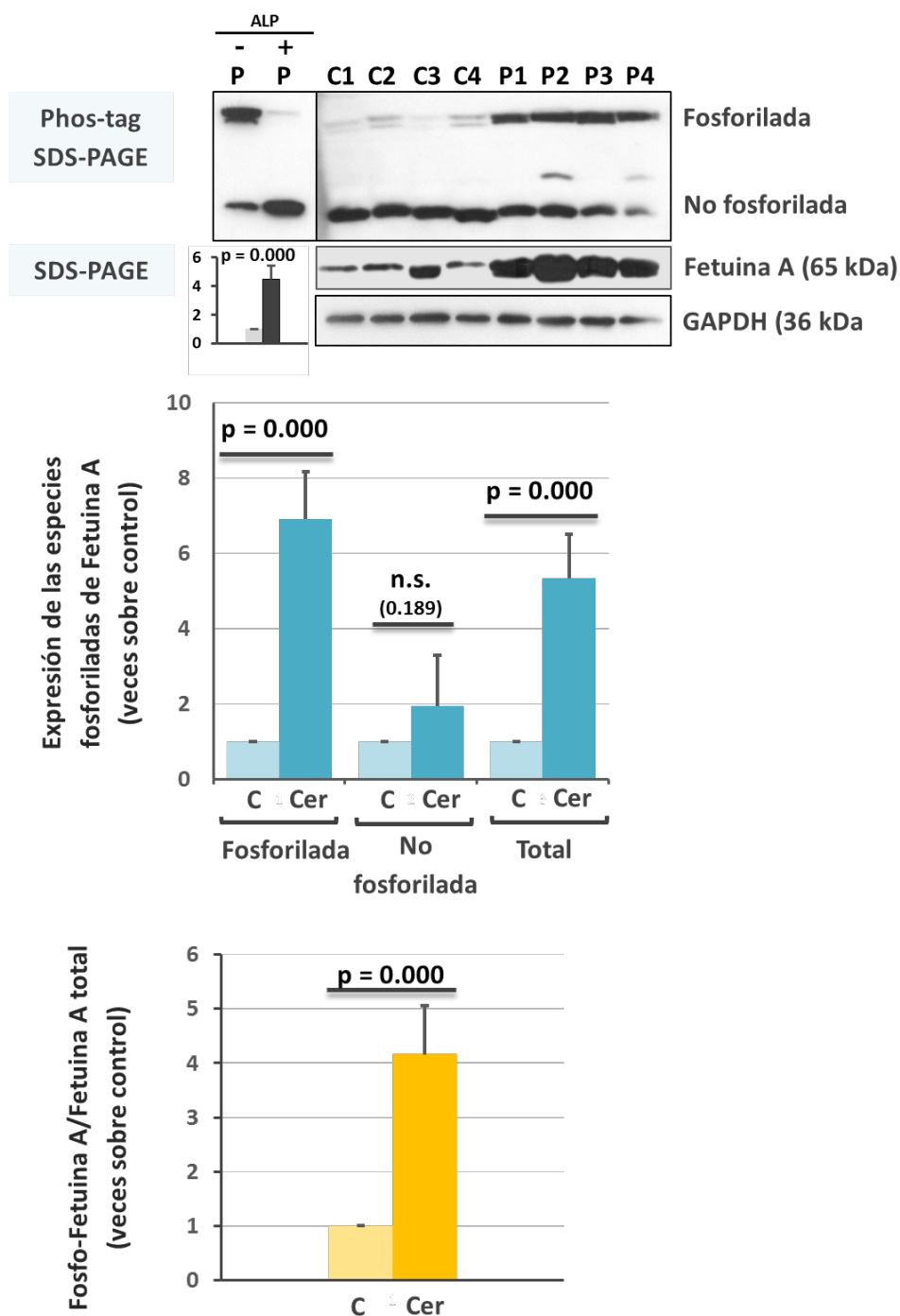


Figura 15. Verificación de las variaciones en el estado de fosforilación de fetuina A durante la fase temprana de la PA inducida por Cer. 7,5 µg/carril de proteína de la fracción soluble se separaron en geles SDS-PAGE al 8% conteniendo 100µM Mn²⁺-Phos-tag o geles convencionales SDS-PAGE al 10%, y posteriormente se transfirieron a membranas PVDF para su inmunodetección. Se representan las medias ± D.S. correspondientes a 8 animales por grupo experimental (n=8). Las imágenes corresponden a blots representativos de los datos. C: control. Cer: ceruleína (pancreática). ALP: fosfatasa alcalina. p: p-valor (U de Mann-Whitney). n.s.: no significativo.

La proteína StARD10 experimenta una drástica disminución de sus niveles de fosforilación ($0,42 \pm 0,10$ veces (banda fosforilada) y $0,24 \pm 0,15$ veces (razón fosfofetúina A – total) en ratas pancreáticas, $p < 0.05$) después del tratamiento con Cer, que en este caso no se correlaciona con variaciones en el nivel de expresión total. El perfil electroforético en geles Phos-tag consta de una sola especie fosforilada. Esto reafirmaría los resultados de LC-MS/MS, en los que solamente se detecta un sitio de fosforilación en StARD10, correspondiente a la Ser²⁸⁴.

StARD10 pertenece a la familia de proteínas START (steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START) domain), que participan en el intercambio lipídico no vesicular entre membranas celulares, mediante la formación de un túnel hidrofóbico capaz de acomodar un lípido monomérico (Alpy and Tomasetto, 2005). StARD10, en concreto, es una proteína transportadora de lípidos con especificidad dual, capaz de transferir fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina entre membranas celulares (Olayioye *et al.*, 2005; Horibata and Sugimoto, 2010). Olayioye *et al.* (2007) demostraron que la fosforilación de la Ser²⁸⁴ (en el extremo C-terminal de StARD10) inhibe su actividad en la transferencia de fosfolípidos, disminuyendo su capacidad de asociación a membranas celulares. Además, observaron que en un cultivo de células HEK293T en condiciones de crecimiento normales, StARD10 está mayoritariamente fosforilada y por consiguiente, su actividad de transferencia lipídica inhibida. Por tanto, podemos inferir que durante la fase temprana de la PA inducida por Cer, la actividad de intercambio de lípidos (concretamente, fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina) entre membranas celulares mediado por StARD10 estaría promovido.

Puesto que la desfosforilación de la Ser²⁸⁴ hipotéticamente favorece la unión de StARD10 a las membranas celulares (Olayioye *et al.*, 2007), podría especularse que la disminución del fosfopéptido correspondiente en la fracción soluble se debe a una mayor presencia en la fracción asociada a membranas. El hecho de que dicho péptido no se encuentre ni en la fracción fosforilada ni en el *flow-through* del extracto de membranas refutaría preliminarmente esta hipótesis.

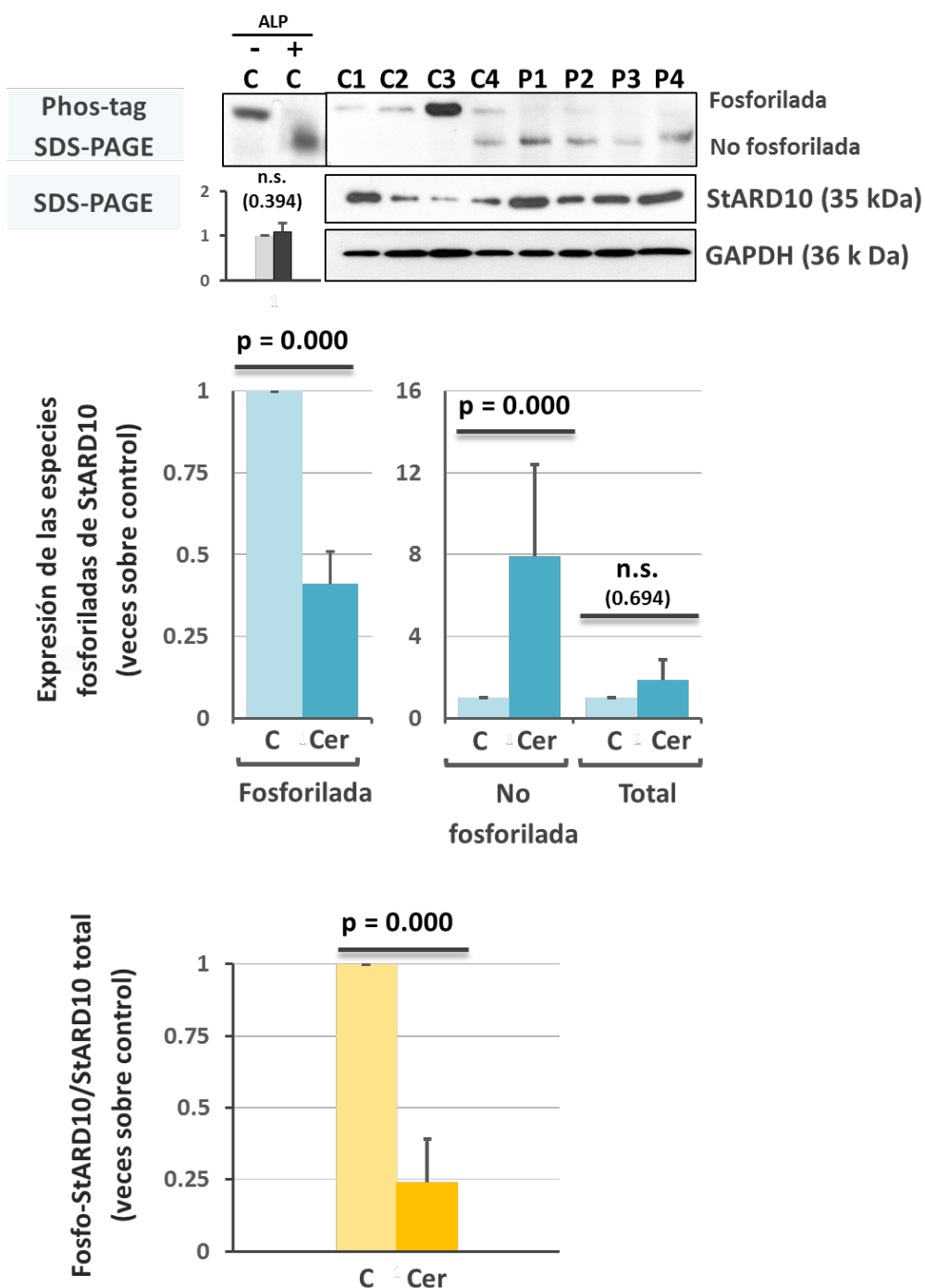


Figura 16. Verificación de las variaciones en el estado de fosforilación de StARD10 durante la fase temprana de la PA inducida por Cer. 10 µg/carril de proteína de la fracción soluble se separaron en geles SDS-PAGE 10% conteniendo 50µM Mn²⁺-Phos-tag o geles convencionales SDS-PAGE al 10%, y posteriormente se transfirieron a membranas PVDF para su inmunodetección. Se representan las medias ± D.S. correspondientes a 8 animales por grupo experimental (n=8). Las imágenes corresponden a blots representativos de los datos. C: control. Cer: ceruleína (pancreática). ALP: fosfatasa alcalina. p: p-valor (U de Mann-Whitney). n.s.: no significativo.

En el caso de las proteínas de la fracción de membranas totales, validamos el incremento en la fosforilación de ARHGAP1, así como la desfosforilación de TP54 (figuras 17 y 18).

ARHGAP1 (CDC42GAP o proteína activadora de GTPasa Rho, 1) es un miembro de la familia de proteínas RhoGAPs, que actúan potenciando la actividad GTPásica intrínseca de las GTPasas Rho para acelerar su conversión a la forma inactiva unida a GDP, implicadas en el control de la expresión génica, la migración e invasión celular o el control del desarrollo (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Johnstone *et al.*, 2004). En concreto, ARHGAP1 es un regulador negativo de las GTPasas Rho y CDC42, del que se ha descrito su implicación como regulador de la apoptosis y supervivencia celular vía CDC42-JNK (Wang *et al.*, 2005), así como de la migración de neutrófilos vía CDC42-ERK (Szczur *et al.*, 2006), ambos procesos íntimamente ligados al desarrollo de la PA.

En la fracción de membranas totales del páncreas de rata, la fosforilación de ARHGAP1 cuyo nivel aumenta en los páncreas pancreatítico ($8,77 \pm 1,28$ veces (bandas fosforiladas) y $6,01 \pm 2,23$ veces (razón fosfofetuína A – total) en ratas pancreáticas, $p < 0.05$), afecta al residuo de Ser⁵¹, localizado en el extremo N-terminal de la proteína. No hemos encontrado referencias en la literatura científica acerca de la fosforilación de ARHGAP1, por lo que nuestros datos podrían ser los primeros que validasen este proceso.

Asimismo, dos miembros de la familia de proteínas tumorales D52: TPD52 y TPD54, experimentaron una reducción en su fosforilación durante la fase inicial de la PA inducida por Cer.

En mamíferos, la familia de proteínas TPD52 consta de cuatro miembros: TPD52, TP53 (o TPD52L1), TPD54 (TPD52L2) y TPD55 (TPD52L3), que se han relacionado con procesos de proliferación celular, apoptosis o tráfico vesicular (Byrne, Mattei and Basset, 1996; Nourse *et al.*, 1998; Boutros *et al.*, 2004). La familia de genes TP52 está muy conservada y codifica para unos pequeños polipéptidos hidrofílicos ácidos, localizados en el citoplasma, y como proteínas periféricas en diversas membranas celulares, (Boutros *et al.*, 2004). Las proteínas D52 ejercen su función tras asociarse a otras proteínas integrales o asociadas a membranas celulares (Wilson *et al.*, 2001;

Thomas *et al.*, 2002; Proux-Gillardeaux *et al.*, 2003) y, presumiblemente, a otros factores de secreción solubles (Thomas *et al.*, 2001).

Ante la ausencia de un anticuerpo comercial adecuado para detectar TPD52 en nuestras muestras, decidimos confirmar la variación en la fosforilación de la proteína tumoral D54. La mayoría de las investigaciones sobre las proteínas TP52 se han centrado en D52, pero son muy escasas las que se ocupan del estudio de TPD54. Diversos estudios han demostrado que D54 comparte características funcionales con D52, con la que en ocasiones se encuentra asociada, por lo que se ha postulado la posibilidad de una regulación conjunta de procesos como el tráfico intracelular de membranas (Nourse *et al.*, 1998; Babiychuk *et al.*, 1999). El hecho de que en nuestro modelo ambas proteínas presenten un comportamiento similar -esto es, que disminuyan sus estados de fosforilación sin alteración aparente del nivel de expresión- está en sintonía con esta afirmación. En concreto, la Ser180 afectada por la pérdida de fosforilación en TPD54 se encuentra en una zona conservada próxima a la región C-terminal de la proteína, que parece facilitar y estabilizar las interacciones establecidas por las proteínas TD52 a través de sus dominios en doble hélice, determinantes para el desempeño de sus funciones (Sathasivam *et al.*, 2001).

También quisimos analizar el patrón de fosforilación de la proteína ARFGAP3 en la fracción de membranas, por su posible papel en la regulación del tráfico vesicular mediado por COPI. Como hemos visto en el capítulo anterior, durante la fase temprana de la PA inducida por Cer se produce una hipotética relocalización de, al menos, las subunidades COPB y COPG del coatómero COPI, implicadas en el transporte retrógrado en el retículo endoplasmático durante las etapas iniciales de las rutas de secreción proteica. Los resultados proteómicos muestran que el descenso en la expresión de ARFGAP3 mencionado en el capítulo anterior, se asocia a una pérdida drástica de la fosforilación del residuo de Ser²⁴² de esta proteína en los animales tratados con Cer. Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible inmunodetectar ARFGAP3 ni en transferencias de Western convencionales ni precedidas de geles Phos-tag, probablemente debido a una presencia minoritaria de esta proteína en nuestras muestras.

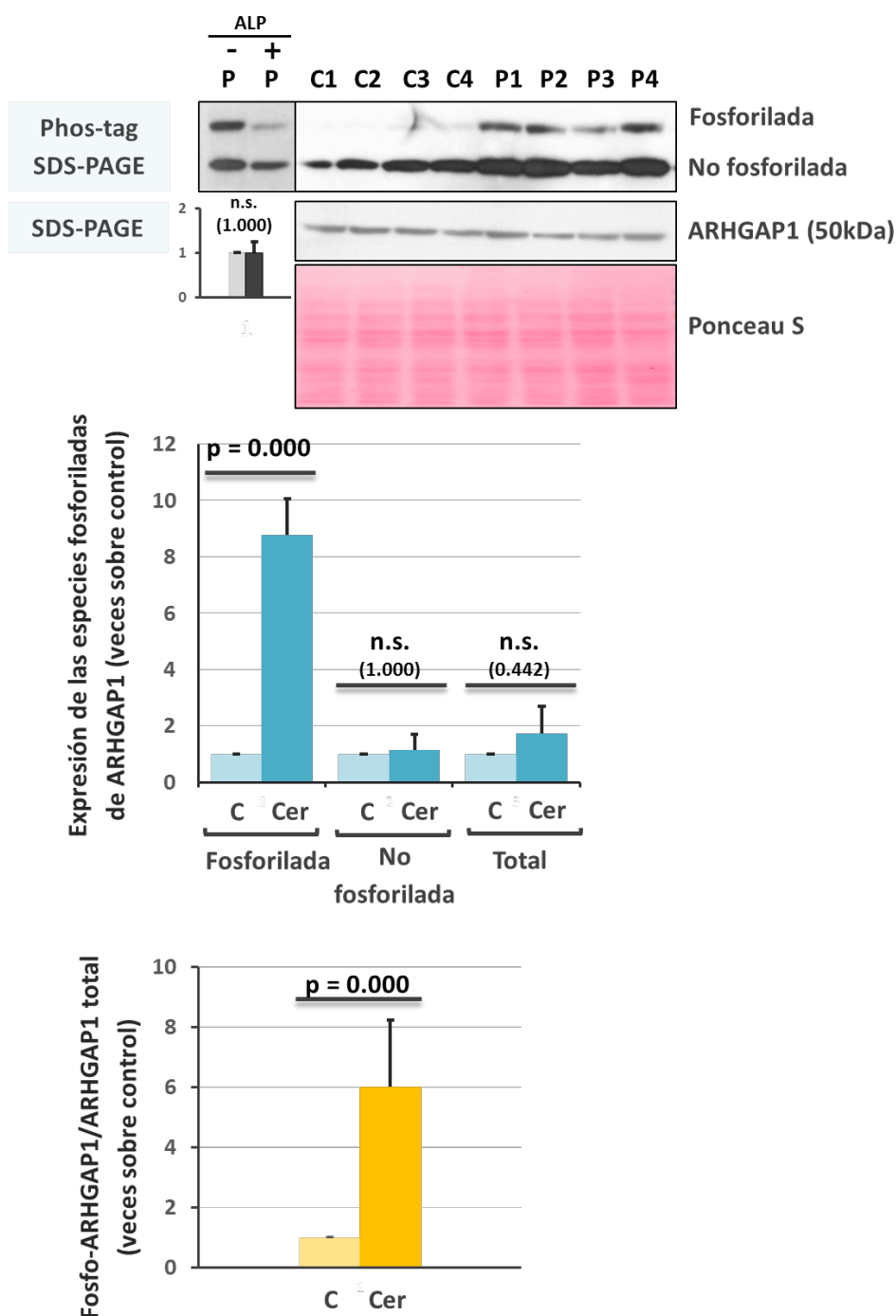


Figura 17. Verificación de las variaciones en el estado de fosforilación de ARHGAP1 durante la fase temprana de la PA aguda inducida por Cer. 30 µg/carril de proteína de la fracción de membranas se separaron en geles SDS-PAGE 10% conteniendo 50µM Mn²⁺-Phos-tag o geles convencionales SDS-PAGE al 10%, y posteriormente se transfirieron a membranas PVDF para su inmunodetección. Se representan las medias ± D.S. correspondientes a 8 animales por grupo experimental (n=8). Las imágenes corresponden a blots representativos de los datos. C: control. Cer: ceruleína (pancreática). ALP: fosfatasa alcalina. p: p-valor (U de Mann-Whitney). n.s.: no significativo.

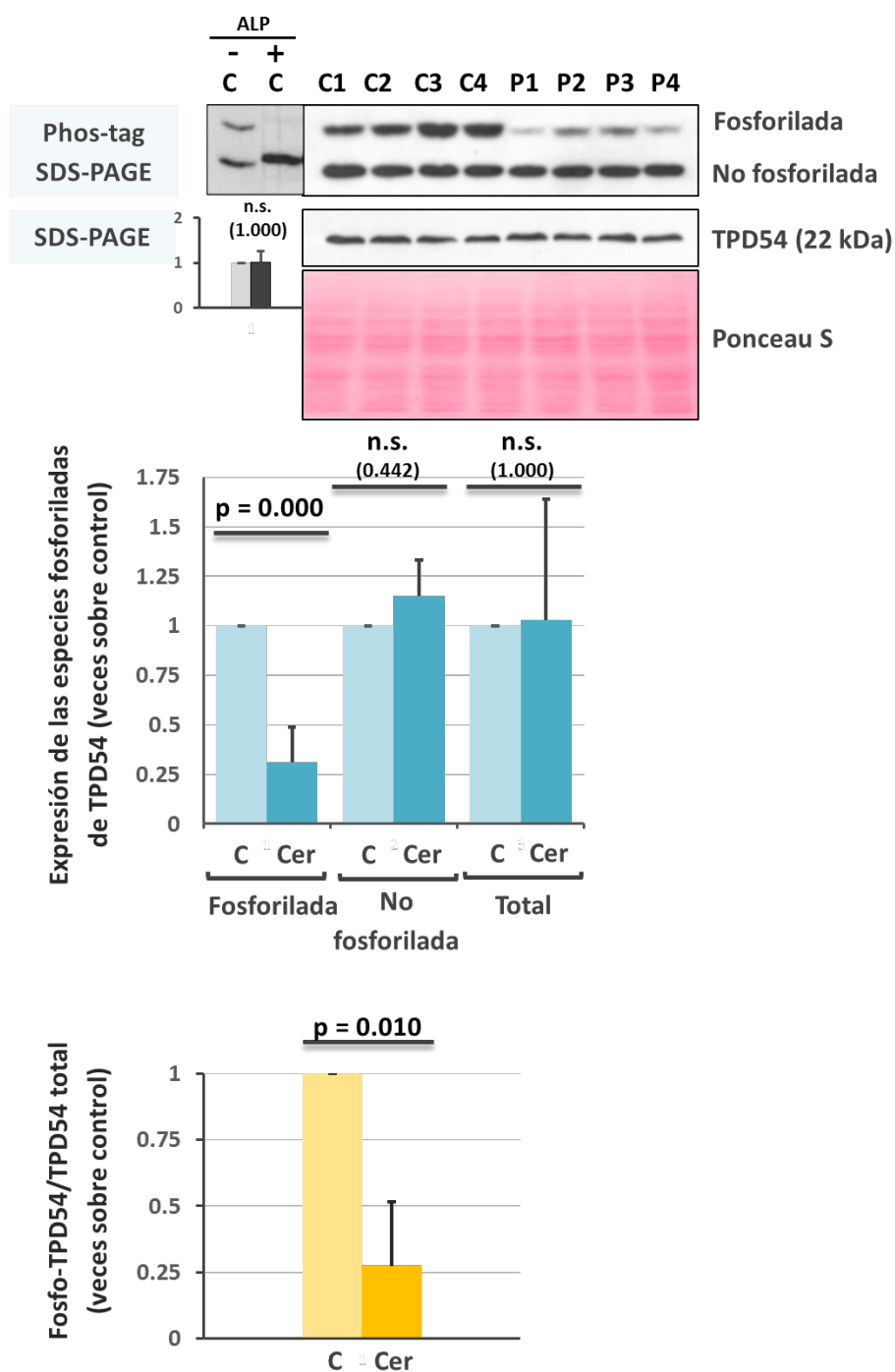


Figura 18. Verificación de las variaciones en el estado de fosforilación de TPD54 durante la fase temprana de la PA inducida por Cer. 30 μg /carril de proteína de la fracción de membranas se separaron en geles Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE 50 μM , 10% conteniendo 50 μM Mn^{2+} -Phos-tag o geles convencionales SDS-PAGE al 15%, y posteriormente se transfirieron a membranas PVDF para su inmunodetección. Se representan las medias \pm D.S. correspondientes a 8 animales por grupo experimental ($n=8$). Las imágenes corresponden a blots representativos de los datos. C: control. Cer: ceruleína (pancreática). ALP: fosfatasa alcalina. p: p-valor (U de Mann-Whitney). n.s.: no significativo.

En conclusión, la caracterización del fosfoproteoma del páncreas durante la fase inicial de la PA experimental, que se realiza por primera vez con nuestro trabajo, proporciona información relevante para mejorar la comprensión de las rutas y mecanismos moleculares tempranos que determinan el desarrollo de la enfermedad. Nuestros resultados revelan proteínas cuya fosforilación temprana se describe por primera vez en relación a la PA, con especial predominio de los procesos relacionados con la estabilidad del sistema de endomembranas y la secreción proteica.

6.

Objetivo 7:

Evaluar preliminarmente el uso potencial clínico de algunos de los cambios proteicos y fosfoproteicos detectados en el modelo animal, en relación con la PA que sobreviene a la colangiopancreatografía endoscópica retrógrada.

Tras caracterizar los cambios proteicos y fosfoproteicos que ocurren en el inicio de la PA experimental, el siguiente objetivo que nos planteamos fue evaluar el uso potencial de algunos de estos candidatos en la PA que sobreviene a la CPRE (colangiopancreatografía endoscópica retrógrada).

6.1. Sujetos de estudio

Para realizar este estudio, se emplearon muestras de plasmas de pacientes sometidos a CPRE que desarrollaron o no una pancreatitis posterior, proporcionados por el Hospital Universitario de Salamanca. Se extrajeron muestras de sangre procedentes de los pacientes unas horas antes de la CPRE (aproximadamente, 4 horas), así como 4 y 24 horas después del procedimiento. Los plasmas se trataron con columnas de ProteoMiner™ para enriquecerlos en proteínas no mayoritarias (como son en principio las proteínas que nos interesa testar). Como control, empleamos muestras de pacientes sometidos a CPRE que no desarrollaron posteriormente una pancreatitis.

Hasta el momento, hemos tenido acceso a cinco plasmas de individuos que desarrollaron una pancreatitis después de la intervención, que hemos emparejado aleatoriamente con cinco plasmas control del mismo sexo e indicación equivalente. La edad, sexo e indicación de CPRE de los sujetos de estudio se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Parámetros clínicos de la población de estudio.

Paciente	Grupo	Edad	Género	Indicación de CPRE
1	Control	86	V	Coledocolitiasis confirmada
2	Control	86	V	Coledocolitiasis confirmada
3	Control	74	M	Colangiocarcinoma
4	Control	60	V	Ictericia no filiada
5	Control	95	M	Coledocolitiasis confirmada
6	PA post-CPRE	82	V	Coledocolitiasis confirmada
7	PA post-CPRE	78	V	Colelitiasis
8	PA post-CPRE	81	M	Coledocolitiasis sospechosa
9	PA post-CPRE	65	V	Ictericia no filiada
10	PA post-CPRE	90	M	Coledocolitiasis confirmada

6.2. Niveles de expresión y fosforilación de fetuina A en el plasma de pacientes con pancreatitis post-CPRE

Es factible presuponer que al menos algunas de las proteínas circulantes cuyos niveles de expresión o fosforilación varían en la fase temprana de nuestro modelo de pancreatitis, podrían ser candidatas potenciales a ser usadas como biomarcadores en algún aspecto clínico de la patología, especialmente aquellas relacionadas con la inflamación y con mecanismos bioquímicos que provoquen modificaciones proteicas. Entre ellas, primero valoramos los niveles de expresión de la alfa-1-antitripsina (AAT). El complejo tripsina 2-AAT se ha propuesto como un posible biomarcador para el diagnóstico temprano de la PA (Kemppainen *et al.*, 2000), ya que incrementa su concentración en plasma horas después de que se produzca la pancreatitis post-CPRE (Lempinen *et al.*, 2005).

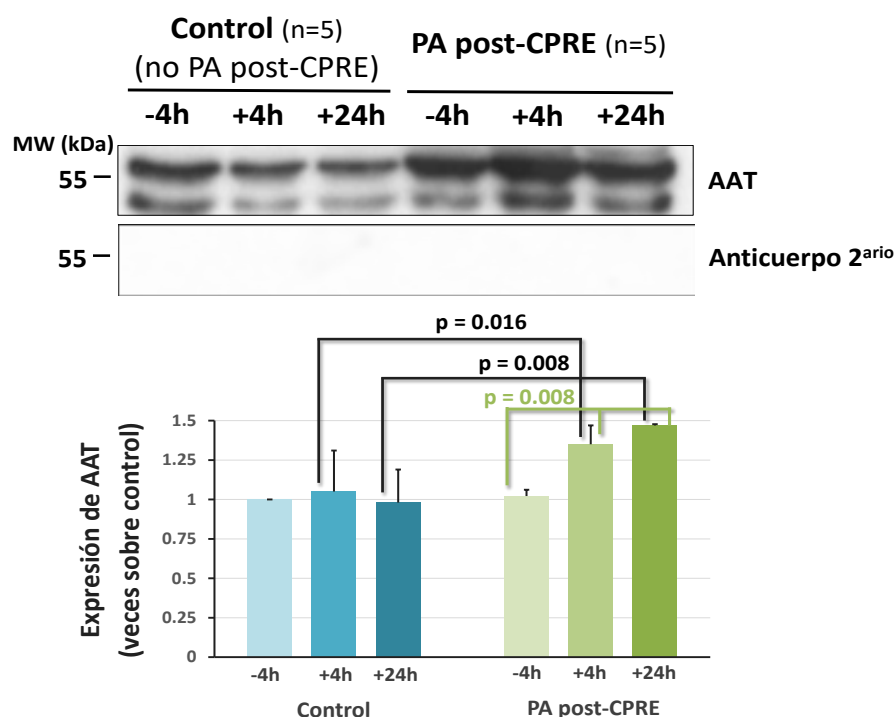


Figura 19. Expresión plasmática de AAT antes (-4h), 4 horas y 24 horas después de la CPRE en pacientes que desarrollaron PA y en controles. 15 µg/carril de proteínas de plasmas tratados en columnas de ProteoMiner se separaron en geles SDS-PAGE al 10% y posteriormente se transfirieron a membranas PVDF para su inmunodetección. Se representan las medias ± D.S. correspondientes a 5 pacientes por grupo experimental (n=5). Las imágenes corresponden a blots representativos de los datos.

Los niveles de expresión de AAT, que no difieren en los dos grupos de pacientes antes de la CPRE, presentan un aumento significativo ya desde unas horas después de la intervención, que se incrementa 24 horas después del procedimiento (figura 19). Este dato es consistente con lo descrito por Lempinen *et al.* (2005) en cuyos experimentos, la concentración plasmática de AAT alcanzaba un pico a las 24 horas de la CPRE, y nos sirvió como prueba fiable para el análisis de otras proteínas como posibles biomarcadores.

A continuación decidimos valorar los cambios a nivel de expresión y fosforilación de la fetuina A, proteína descrita como de fase aguda negativa en la clínica de la PA (Kuśnierz-Cabala *et al.*, 2010).

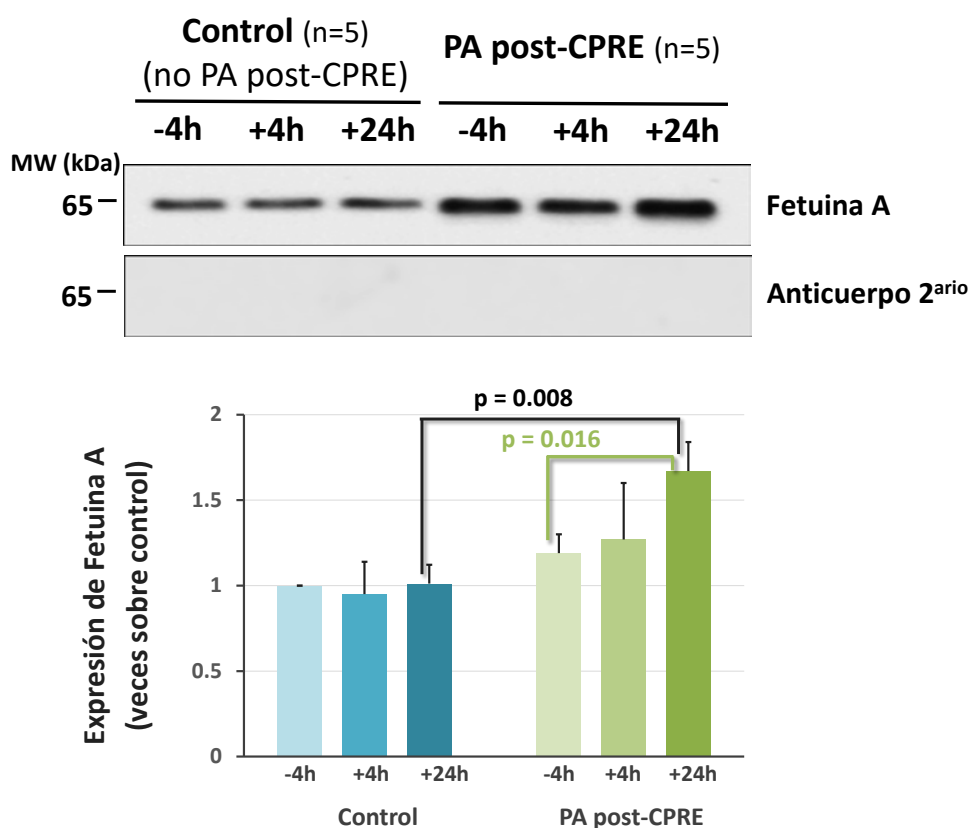


Figura 20. Expresión plasmática de fetuina A antes (-4h), 4 horas y 24 horas después de la CPRE en pacientes que desarrollaron PA y en controles. 15 µg/carril de proteínas de plasmas tratados en columnas de ProteoMiner se separaron en geles SDS-PAGE al 10% y posteriormente se transfirieron a membranas PVDF para su inmunodetección. Se representan las medias ± D.S. correspondientes a 5 pacientes por grupo experimental (n=5). Las imágenes corresponden a blots representativos de los datos.

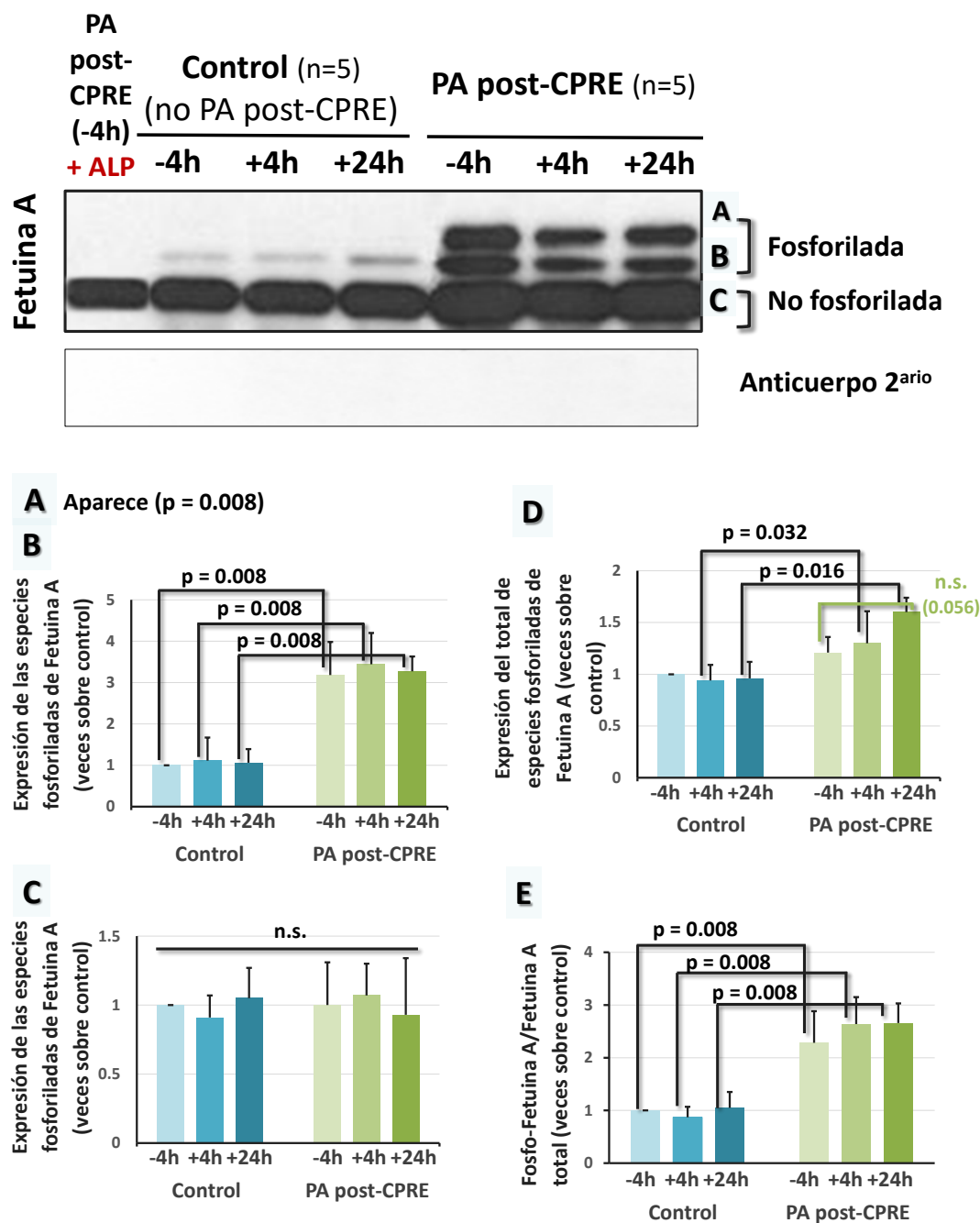


Figura 21. Variación en el estado de fosforilación de fetuina A antes (-4h), 4 horas y 24 horas después de la CPRE en pacientes que desarrollaron PA y en controles. 7,5 μg /carril de proteína de la fracción soluble se separaron en geles SDS-PAGE al 8% conteniendo 85 μM Mn^{2+} -Phos-tag y posteriormente se transfirieron a membranas PVDF para su inmunodetección. (A) Isoforma fosforilada superior. (B) Isoforma fosforilada inferior. (C) Forma no fosforilada. (D) Total (suma de todas las bandas). (E) Isoformas fosforiladas con respecto al total. Se representan las medias \pm D.S. correspondientes a 5 pacientes por grupo experimental ($n=5$). Las imágenes corresponden a blots representativos de los datos. ALP: fosfatasa alcalina. p: p-valor (U de Mann-Whitney). n.s.: no significativo.

Los resultados de expresión, representados en la figura 20, muestran una tendencia a un mayor nivel de fetuina A en los plasmas de pacientes pancreatíticos antes de ser intervenidos. Sin embargo, la diferencia sólo es estadísticamente significativa 24 horas después de la CPRE. Sería necesario ampliar el tamaño muestral para caracterizar fielmente el comportamiento de fetuina A plasmática en la PA post-CPRE.

Las variaciones en fosforilación se analizaron en geles Phos-tag SDS-PAGE y se expresaron tanto a nivel individual comparando cada especie de fosforilación (o el total) entre grupos, como mediante el cociente entre las especies fosforiladas con respecto al total de bandas de la misma muestra. Una muestra de plasma del grupo pancreatítico tratada con fosfatasa alcalina se utilizó para identificar la forma no fosforilada.

Como se observa en la figura 21, los pacientes que desarrollan pancreatitis tras la intervención presentan un mayor estado de fosforilación de fetuina A plasmática (figura 21E), ya detectada antes de realizar la CPRE, y que se mantiene aproximadamente igual después de la misma. Además, en los cinco plasmas analizados detectamos la presencia de una isoforma más fosforilada, que no se detecta en el grupo control. Como ya comentamos en el capítulo anterior, la fetuina A plasmática de humanos parece estar fosforilada en un 20%, pudiendo fosforilarse los residuos Ser¹²⁰ (de forma constitutiva) y Ser³¹² (sometido a regulación covalente) (Haglund *et al.*, 2001). Por tanto, podríamos especular que en nuestras muestras nos encontramos ante una banda parcialmente fosforilada - presumiblemente en la Ser¹²⁰ - que tiende a aumentar su presencia en los pacientes que desarrollarán una pancreatitis post-CPRE, y ante una isoforma totalmente fosforilada -en los residuos Ser¹²⁰ y Ser³¹²- como consecuencia de la fosforilación *de novo* del residuo Ser³¹². No obstante, investigaciones de otros autores sobre el fosfoproteoma del suero humano propusieron que otras serina de la proteína podrían estar sujetas a fosforilación (Zhou *et al.*, 2009), por lo que actualmente no está claro qué especies de fosforilación específicas corresponden a cada una de las bandas y su significado individual.

6.3. Otras perspectivas futuras

A lo largo de esta memoria, hemos indicado que las rutas de señalización NADPH/ROS/MAPKs/Jak-Stat3/TGF- β 1/AMPC-PKA son importantes en el desarrollo de la PA. Consideramos que este hecho evidencia la importancia del estudio exhaustivo de las dianas moleculares que se verían afectadas por el bloqueo o modulación de dichas rutas de señalización, así como por la infiltración. Especialmente, aquellas dianas cuyos niveles de expresión y/o de fosforilación variasen de modo análogo con la modulación de las diferentes rutas de señalización señaladas y/o con la infiltración, podrían ser significativas respecto a la fisiopatología de la PA. Por consiguiente, sería interesante investigar las dianas proteicas y fosfoproteicas afectadas en la fase temprana y una vez establecida una PA por Cer, tras bloqueo o modulación de MAPKs, ruta del AMPC e infiltración. A este respecto, hemos realizado ya análisis proteómicos masivos por TMT en diferentes grupos animales tratados con los inhibidores de MAPKs y de diferentes tipos de infiltración descritos en capítulos anteriores. Sin embargo, no hemos incluido ninguno de estos resultados en la memoria porque no hemos tenido tiempo para su procesamiento detallado.



V. Discusión

SOBRE EL DISEÑO EXPERIMENTAL

En el caso de la PA, el hecho de que no puedan utilizarse muestras de páncreas humano en vida, hace que el conocimiento básico, a nivel molecular, de la fisiopatología de la pancreatitis resida fundamentalmente en modelos animales. En este trabajo hemos empleado el modelo experimental de PA inducido en la rata por estimulación con el agente trófico Cer [un análogo de la colescistoquinina (CCK)], ya que reproduce histológicamente la fase temprana de la pancreatitis aguda de humanos (Chan y Leung, 2007). En concreto, simula de modo bastante reproducible una PA moderada y edematosa. Esta característica hace que su uso sea muy adecuado cuando se analizan fenómenos bioquímicos o fisiológicos durante el desarrollo de la enfermedad, o cuando se emplean técnicas experimentales que conducirán a conclusiones muy dependientes de una gran reproducibilidad del modelo. En la bibliografía se describe el uso de dosis diferentes de Cer (desde 5 hasta 100 µg/Kg) para inducir PA en ratas. En nuestras condiciones experimentales [inyecciones s.c. de 20 µg/Kg], las manifestaciones de la PA incluyen hiperamilasemia, aumento del peso pancreático, aumento del tamaño de las células acinares, edema intersticial, vacuolización celular y otras alteraciones morfológicas, e infiltración por leucocitos (Alonso *et al.*, 1994; Pescador *et al.*, 1995; Yönetçi *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007).

SOBRE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DURANTE LA FASE TEMPRANA DE LA PA INDUCIDA POR CERULEÍNA

Los análisis proteómicos de extractos de tejidos en los modelos animales son una potente herramienta para la obtención de nuevos datos acerca de los procesos biopatológicos de la PA, ya que permiten la identificación de las proteínas específicas cuya expresión se ve alterada durante el desarrollo de la enfermedad. Además, estos análisis pueden desenmascarar nuevos marcadores diagnósticos o pronósticos de la PA. Los análisis que emplean técnicas TMT/2-DE y MS/MS aplicadas al estudio de la PA son escasos y se han focalizado en sistemas modelo celulares (células acinares pancreáticas AR42J) (Yu *et al.*, 2003a, 2008) y en un modelo de pancreatitis en roedores una vez que la patología se desarrolla completamente (Lassout *et al.*, 2010), analizando en su

conjunto mezclas complejas de proteínas correspondientes a la fracción soluble de un homogenado de las células en cultivo (rango de pH 5-8) o del páncreas total (rango de pH 4-7). Nosotros hemos dividido el desarrollo de la PA en nuestro modelo animal en tres fases: temprana, intermedia y final (2, 4 y 9 h después de la primera inyección de Cer, respectivamente). Asimismo, hemos descrito que varias PTPs se sobreexpresan durante la fase temprana (Sarmiento *et al.*, 2008, 2010). Tomando en consideración la importancia potencial de los cambios de expresión proteica en la PA, que estos cambios pueden ser diferentes de los que ocurren en la PA completamente desarrollada, de nuestro interés por el estudio de diversas proteínas lisosómicas, y porque no conocemos estudios proteómicos que se hayan realizado en fracciones subcelulares de páncreas durante la fase temprana del desarrollo de la PA, realizamos un análisis 2-DE de las proteínas ácidas que cambian en las fracciones subcelulares soluble y de lisosomas+mitocondrias durante la fase temprana de la PA inducida por Cer en la rata. Con el estudio pretendimos identificar nuevas proteínas que podrían estar implicadas en rutas centrales de la patobiología de la PA. Con respecto a la fracción soluble, detectamos principalmente cambios en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y la apoptosis (α 1-inibidor-3, α 1-antitripsina, α 1-macroglobulina, haptoglobina, STRAP), el estrés oxidativo y las respuestas al estrés (peroxiredoxina-2, tioredoxina 1, GRP94/TRA1, proteína de choque térmico de 71 kDa), proteasas digestivas (elastasa B3), inhibidores de serina proteasas (serpinas B6 y A3L) y proteínas relacionadas con los procesos de transcripción (EF 1- δ). En la fracción de lisosomas y mitocondrias, detectamos cambios proteicos principalmente relacionados con la generación de energía y el metabolismo celular (subunidad β de la ATP sintasa o ATP5B, quimotripsinógeno B, triacilglicerol lipasa), la homeostasis redox celular (yodotironina 5'-monodeiodinasa) y proteasas digestivas (carboxipeptidasa B1). Por lo tanto, en total identificamos 20 proteínas o fragmentos de proteínas cuya expresión está alterada en dicha fase temprana. De éstas, se sobreexpresan 4 proteínas que no habían sido previamente descritas en PA: proteína asociada a receptor Ser/Thr (STRAP), Serpina B6 y A3L y tioredoxina-1. La temprana sobreexpresión in vivo de STRAP es significativa porque STRAP inhibe la señalización por la citoquina inflamatoria TGF- β 1 implicada en la fisiopatología de la PA (Halder *et al.*, 2006), y pudiera ser el puente de unión entre la señalización JNK/p38 mediada por ASK1 (Jung *et al.*, 2010) y TGF- β . Por otro lado, la

temprana sobreexpresión in vivo de la tiorredoxina-1 también es significativa porque su sobreexpresión atenúa el daño pancreático en la PA grave (Ohashi *et al.*, 2006). En el caso de la ATP5B detectamos el aumento de un fragmento de 25 kDa, aunque la proteína intacta permanece más o menos sin cambios de expresión, a diferencia de la disminución que sucede cuando la PA está desarrollada (Fétaud *et al.*, 2008), o el aumento de expresión que se ha observado cuando se usan células pancreáticas acinares en cultivo (Yu *et al.*, 2003a, 2003b). Nuestros resultados sugieren que en el modelo animal utilizado por nosotros hay un aumento de la proteólisis de ATP5B desde la fase temprana de la PA.

A pesar de que uno de nuestros objetivos al realizar estos estudios 2-DE era poder encontrar cambios en los niveles de expresión de proteínas de membranas lisosómicas, especialmente de las proteínas LAMP y LIMP, probablemente la escasa solubilidad de estas proteínas en los medios que se emplean en esta técnica proteómica, imposibilitó la detección adecuada de estas proteínas de membrana. No obstante, por otro tipo de experimentos realizados por nuestro grupo de investigación, creíamos que algunas de las especies de dichas familias proteicas podrían verse alteradas durante el desarrollo de la PA inducida por Cer. Por consiguiente, realizamos un estudio acerca de los cambios de expresión de la proteína integral de membrana lisosómica-2 (LIMP-2) en la PA. LIMP-2 tiene un papel relevante en la biogénesis y función del lisosoma, y también juega un papel en la respuesta inflamatoria, donde la infiltración por leucocitos favorece el desarrollo temprano de la patología. En este trabajo demostramos que la expresión pancreática de LIMP-2 aumenta tanto a nivel de proteína como de ARNm desde la fase temprana de la PA inducida por Cer. La fuente principal de este aumento de LIMP-2 son las células acinares pancreáticas. Asimismo, demostramos que dicho incremento está regulado y/o modificado por la infiltración y por la inhibición de MAPK. Respecto a la infiltración, una dosis no tóxica de cloruro de gadolinium ($GdCl_3$), un inhibidor de macrófagos, revierte el aumento de los niveles de expresión de LIMP-2 debido a Cer que observamos en el páncreas total, lo que sugiere una influencia de las citoquinas producidas por los macrófagos residentes en el páncreas, que son las principales células productoras de citoquinas inflamatorias en la PA (Gloor *et al.*, 2000). Curiosamente,

dicha reversión necesita la presencia de neutrófilos, porque la neutropenia inducida por sulfato de vinblastina, elimina la acción del $GdCl_3$, sin afectar a la expresión de LIMP-2 en los animales no pancreatíticos. En conjunto, nuestros resultados sugieren algún tipo de entendimiento o comunicación entre macrófagos y neutrófilos durante el proceso de infiltración del páncreas en la PA, en la cual, la cantidad de células infiltrantes podría jugar un papel destacado. En este sentido, se conoce que el factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citoquinas producidas por los neutrófilos, inducen la diferenciación y activación de los macrófagos (Nathan, 2006). También se ha implicado a los linfocitos activados, especialmente a los linfocitos T, en el desarrollo de la PA (Vonlaufen *et al.*, 2007). Sin embargo, el bloqueo de los linfocitos con FK506, una droga sin efectos adversos en el páncreas exocrino, que inhibe calcineurina (fosfatasa que modula la expresión de genes de citoquinas) después de unirse a las inmunofilinas intracelulares de los linfocitos T (Dumont, 2000), o un estado neutropénico previo al bloqueo linfocitario, no cambia el aumento de expresión de LIMP-2 debido a Cer en el páncreas total.

En conjunto, nuestros resultados indican que los neutrófilos pueden favorecer una activación de macrófagos que sería capaz de regular el aumento de expresión de LIMP-2 durante la fase temprana de la PA inducida por Cer.

Por otro lado, la estimulación del páncreas con Cer activa la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (que es un mecanismo patogénico central en enfermedades inflamatorias en general), incluyendo a la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) y a la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) (Widmann *et al.*, 1999; Minutoli *et al.*, 2004). Otra ruta que también se activa en la PA es la ruta del receptor de adenosina A1 (Sato *et al.*, 2000), que disminuye los niveles de AMPc intracelular. La importancia de la activación de estas rutas en la PA se pone de manifiesto porque: (1) se activan en su fase más temprana (horas 1-1,5) (Höfken *et al.*, 2000; Clemons *et al.*, 2002; Minutoli *et al.*, 2004), y la activación de MAPKs regula muchos de los factores de transcripción que se inducen de modo temprano en el desarrollo de la PA (Ji *et al.*, 2003), así como la traducción proteica; (2) al menos para ERK1/2, JNK y receptor de adenosina A1, su inhibición disminuye la gravedad de la PA inducida por Cer

(Sato *et al.*, 2000; Minutoli *et al.*, 2004); de hecho, un aumento intracelular de AMPc en las células inflamatorias atenúa la gravedad de numerosos procesos inflamatorios, incluida la PA (Sato *et al.*, 2006), por lo que el AMPc podría jugar un papel relevante en su patogénesis (Sato *et al.*, 2006). AMPc y MAPKs están relacionadas porque: (1) en células pancreáticas humanas, niveles elevados de AMPc inhiben la cascada de señalización de ERK (Boucher *et al.*, 2001); (2) las especies reactivas del oxígeno (ROS) actúan como segundos mensajeros desencadenantes de varias respuestas inflamatorias incluida la pancreatitis; (3) en PA, la activación in vivo de la ruta AMPc/PKA reduce la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α (Semmler, Wachtel and Endres, 1993).

En este trabajo demostramos que pre-tratamientos con los inhibidores de MAPKs: SP600125 y PD98059, inhibidores de JNK y ERK1/2, respectivamente, pero no con rolipram, un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo IV, suprimen el aumento en la expresión de LIMP-2 detectado durante la fase temprana de la PA inducida por Cer. En concreto, tanto JNK como ERK1/2 parece que juegan un papel coordinado, porque los inhibidores de ambas quinasas producen efectos similares. El papel de JNK también es interesante porque como dijimos anteriormente, STRAP, que actúa como un regulador negativo de la cascada de señalización de ASK-1 (quinasa 1 de regulación de la señal apoptótica) mediada por JNK, se sobreexpresa durante dicha fase temprana de la PA. La falta de efecto del rolipram está de acuerdo con la implicación de la infiltración en la sobreexpresión de LIMP-2 descrita arriba, porque se sabe que el aumento en AMPc reduce de modo general la infiltración (Semmler, Wachtel and Endres, 1993), y el rolipram suprime la infiltración por neutrófilos en el páncreas debida a Cer (Sato *et al.*, 2000). Como la fosfodiesterasa tipo IV se expresa de modo muy abundante en los neutrófilos, probablemente el rolipram actúa al menos en los neutrófilos, ejerciendo una acción anti-inflamatoria a través de la inhibición de diversas funciones leucocitarias tales como la producción y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.

Con objeto de utilizar nuevas técnicas proteómicas nos propusimos realizar experimentos de caracterización de perfiles de expresión proteica mediante aproximaciones proteómicas de análisis masivo. En primer lugar hemos realizado un análisis proteómico TMT (Tandem Mass Tag) durante la fase temprana de la PA inducida

por Cer en nuestro modelo experimental. Decidimos realizar el estudio en dos fracciones subcelulares pancreáticas: la fracción soluble y la fracción de membranas totales con la intención de poder identificar más fácilmente proteínas minoritarias que pudieran quedar enmascaradas en mezclas más complejas, como es el caso de los homogenados totales. Este estudio complementado con diversas aproximaciones bioinformáticas nos permitió identificar las proteínas diferencialmente expresadas y adscribirlas a diversos mecanismos moleculares relevantes en la patogénesis de la PA, como son el transporte proteico vesicular, las alteraciones lisosómicas y mitocondriales y la proteólisis. Asimismo, observamos que numerosos procesos metabólicos son regulados negativamente, aparentemente para reducir el consumo energético, y por el contrario, las respuestas al estrés e inflamatoria están muy desarrolladas. De las 18 proteínas que se analizaron por inmunoblots con objeto de validar nuestros resultados proteómicos, algunas se han descrito por vez primera como asociadas al desarrollo de la PA. Tal es el caso de VPS29 y MCTS-1 asociadas a la fracción de membranas. VPS29 es uno de los componentes de un gran complejo multimérico implicado en el transporte retrógrado de proteínas desde los endosomas al *trans*-Golgi. La disminución en los niveles de expresión de VPS29, detectada en este trabajo en la fracción de membranas, parece indicar una alteración temprana en la función del sistema vacuolar. MCTS-1 es un regulador de la ruta de señalización MEK-ERK (Shih *et al.*, 2012) y en condiciones de estrés celular, su disminución se asocia a un aumento de la apoptosis y activación de caspasas. Por lo tanto, la disminución de la expresión de MCTS-1 detectada por nosotros podría ser relevante ya que, como hemos indicado anteriormente, Cer activa la cascada de las MAPKs de modo temprano durante el desarrollo de la PA. También es importante reseñar que en un estudio proteómico de un modelo de pancreatitis necrotizante se ha descrito que MCTS-1 disminuye sus niveles de expresión, aunque el dato no se validó con una segunda técnica (Fétaud-Lapierre *et al.*, 2013).

Otro aspecto que se describe en este trabajo, y por vez primer en PA, es el desequilibrio de algunas proteínas COP durante la fase temprana de la patología. Los coatómeros libres en el citoplasma se asocian con vesículas que participan en el transporte de proteínas entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi. Aquí hemos comprobado que la disminución de la expresión de COPB y COPG asociados a la

fracción de membranas totales de páncreas, resulta en un aumento de la expresión de ambos coatómeros en la fracción soluble, sin aumento de la expresión de dichas proteínas en homogenados totales postnucleares. Estos datos parecen indicar algún tipo de redistribución de los coatómeros durante la fase temprana de la PA inducida por Cer. Además, la disminución de la expresión de los coatómeros en las membranas podría reflejar una reducción en el tráfico proteico, posiblemente relacionado con el estrés que ocurre en pancreatitis a nivel del retículo endoplasmático, ya desde una fase temprana. Esta reducción del tráfico sería relevante para el bloqueo de la secreción asociado a la pancreatitis. La reducción en la formación de vesículas también es consistente con la disminución de la expresión de ARFGAP3 asociada a la fracción de membranas (datos no validados por inmunoblot), que refleja nuestros datos proteómicos, ya que ARFGAP3 es esencial para la formación de la matriz que recubre las vesículas COPI (Kartberg *et al.*, 2010). Este comportamiento de los coatómeros en la PA edematosa inducida por Cer es diferente de la que se ha descrito en el caso de la pancreatitis necrotizante, donde, aunque no han podido obtenerse resultados interpretables con confianza, sí se observado la formación de productos de degradación de los coatómeros (Fétaud-Lapierre *et al.*, 2013), algo que no se produce en nuestro modelo experimental.

Se ha descrito que la Cer puede modular la fosforilación en tirosinas (Rivard *et al.*, 1994, 1995), un mecanismo regulatorio central de muchas funciones celulares, entre las que se incluyen el mantenimiento de los complejos de adhesión (Müller *et al.*, 1999), que se disocian en pancreatitis (Lerch *et al.*, 1997; Schnekenburger *et al.*, 2005). El nivel de fosforilación en tirosinas se debe a la acción conjunta de proteína tirosina quinasas y PTPs. En PA, las PTPs juegan un papel al menos en la regulación de los procesos de exocitosis de las células acinares exocrinas pancreáticas (Feick *et al.*, 1999), así como en diferentes enfermedades inflamatorias. Además, las PTPs pueden ser inactivadas por especies reactivas de oxígeno o productos secundarios de oxidación que pueden formarse durante el desarrollo de la PA (Sánchez-Bernal *et al.*, 2004). Nuestro grupo de investigación demostró recientemente y por primera vez (usando ratas como modelo experimental) (Sarmiento *et al.*, 2008, 2010) que: (1) la PA inducida por Cer cursa con aumentos en los niveles de expresión de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP) SHP-1,

SHP-2 y PTP1B a nivel proteico y génico; (2) que dicho aumento ocurre mayoritaria o totalmente en las células acinares; (3) que cursa con cambios en la dinámica de localización subcelular de, específicamente, SHP-2; (4) que dichos cambios suceden en las fases tempranas de la PA inducida por Cer, lo que potencialmente tiene un importante significado funcional en el desarrollo de la PA; (5) que el aumento de expresión de SHP-2 sucede también en los modelos de PA producidos por infusión de taurocolato sódico en el conducto pancreático, o el modelo de la ligadura del conducto bilio-pancreático; (6) que los niveles de expresión de las 3 PTPs están modulados de algún modo por la inhibición de MAPK, aunque la enzima específica implicada en esta modulación se desconocía; (7) que la infiltración por leucocitos parece modular de algún modo los niveles de expresión proteica de SHP-2 y PTP1B.

SHP-1 juega un papel en las rutas de señalización Jak-Stat y MAPK (You and Zhao, 1997), SHP-2 participa al menos en las rutas Ras-Raf-MAPK, Jak-Stat, PI3 quinasa y NF- κ b (Qu, 2002). PTP1B tiene un papel central en el control de las rutas de señalización por varias citoquinas vía su influencia en diversos miembros de la ruta Jak/Stat (Bourdeau, Dubé and Tremblay, 2005). Todas las rutas de señalización anteriores se han implicado de algún modo en el desarrollo de la PA.

En vista de todos los datos anteriores y dado nuestro interés en comenzar a investigar la implicación de las modificaciones proteicas postraduccionales debidas a fosforilación (ver apartado siguiente), decidimos investigar las MAPKs particulares que modulaban los niveles de expresión de SHP-1, SHP-2 y PTP1B durante la fase temprana de la PA inducida por Cer. Para ello utilizamos los inhibidores de JNK y ERK: SP600125 y PD98059, respectivamente. Como el tratamiento con Cer en nuestras condiciones experimentales no activa la MAPK p38, el uso de los inhibidores anteriores, que se comprobó era específico para JNK o ERK, nos permitió desenmascarar la MAPK que modula la expresión de las distintas PTPs. Comprobamos que JNK actúa previniendo que SHP-1 incremente su expresión más allá de cierta cantidad, y modula negativamente a las PTPs con dominios SH2; que ERK1/2 es la principal MAPK implicada en el aumento de expresión de SHP-2, y que tanto JKK como ERK1/2 juegan un papel en el aumento de expresión de PTP1B. También comprobamos, utilizando el inhibidor de la fosfodiesterasa tipo IV, rolipram, que niveles elevados de AMPc intracelular suprimen

significativamente el incremento de la expresión proteica de SHP-2 y PTP1B debida a Cer. Esta modulación de la expresión de PTPs intracelulares por rutas de señalización importantes en el desarrollo de la PA (MAPKs y AMPc) indica que la regulación de los fenómenos de fosforilación en tirosinas podría desempeñar un papel relevante en su desarrollo.

Por otro lado, también estudiamos el papel de la infiltración por diversos tipos de leucocitos en el incremento de la expresión de las 3 PTPs debida a Cer, ya que la infiltración por neutrófilos es el suceso universal de los procesos inflamatorios agudos o crónicos, y la evidencia de activación celular. Para ello usamos los inhibidores de células sanguíneas blancas: sulfato de vinblastina, $GdCl_3$ y tacrólimo (FK506), un antagonista de la calcineurina, inactivador linfocitario con efecto inmunomodulador que disminuye preferencialmente la proliferación de linfocitos T. Comprobamos que ni la actividad de los macrófagos ni la de los linfocitos modulan los cambios de expresión de las PTPs, pero que la infiltración por neutrófilos es un regulador de los cambios de expresión de SHP-2 y PTP1B debida a Cer. Estos resultados con PTP1B concuerdan con los descritos para rolipram, ya que la fosfodiesterasa tipo 4 está muy expresada en los neutrófilos, por lo que rolipram al menos actuaría a nivel de neutrófilos, probablemente ejerciendo efectos antiinflamatorios al inhibir diversas funciones leucocitarias tales como la producción y/o secreción de citoquinas proinflamatorias. Globalmente, los datos parecen indicar que existe algún tipo de comunicación cruzada entre la infiltración por neutrófilos y la célula acinar pancreática que merece ser estudiada en un futuro.

SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DURANTE LA FASE TEMPRANA DE LA PA INDUCIDA POR CERULEÍNA

Los análisis fosfoproteómicos se realizaron en las fracciones subcelulares soluble y de membranas totales del páncreas durante la fase temprana de nuestro modelo de PA mediante 2-DE (tinción específica de fosfoproteínas y MALDI-TOF MS/MS, solo en la fracción soluble) y con marcado con TMT⁶ y enriquecimiento de fosfopéptidos seguido de LC-MS/MS (fracciones soluble y de membranas). Con ambas aproximaciones se observa que los fenómenos de fosforilación diferencial afectan principalmente a

proteínas cuya función está relacionada con la modulación del sistema endolisosómico y del retículo endoplasmático, con el tráfico de proteínas y membranas o la exocitosis, así como con la traducción proteica. Sin embargo, solamente detectamos una fosfoproteína con regulación diferencial mediante ambos métodos, la fetuina A.

La fetuina A es una glicoproteína sérica producida principalmente en el hepatocito y frecuentemente relacionada con la respuesta inflamatoria en patologías de diversa índole (Kuśnierz-Cabala *et al.*, 2010; Sindhu *et al.*, 2016). Sin embargo, la función de la fosforilación de fetuina A se he centrado principalmente en su papel en los mecanismos de resistencia a la insulina (inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina (Auberger *et al.*, 1989; Mathews *et al.*, 1997, 2000)) y obesidad. Recientemente se ha descrito que el tejido adiposo también secreta fetuina A fosforilada en condiciones patológicas (Pérez-Sotelo *et al.*, 2017). Además, en diferentes estudios sobre calcificación vascular asociada al daño renal efectuados en rata (Matsui *et al.*, 2009) o en humano (Smith *et al.*, 2012) se ha demostrado la presencia de fosfofetuina en partículas minerales circulantes y así como su efecto modulador sobre la secreción de citoquinas y TNF α por macrófagos (Smith *et al.*, 2013).

El mecanismo de regulación de la fetuina parece de algún modo relacionado con las cascadas de señalización por MAPKs. En concreto, se ha descrito un efecto promotor de la ruta de ERK1/2 -pero no de la vía de JNK- sobre la síntesis de fetuina A en el hepatocito (Takata *et al.*, 2009). Sería interesante conocer si la activación de las MAPKs ERK1/2 y JNK que modulan la respuesta en la célula acinar pancreática durante las fases iniciales de la pancreatitis e influyen en su desarrollo, actúa también a nivel del hepatocito dirigiendo la sobreproducción de fetuina A biológicamente activa. Por otra parte, la sobreexpresión de fetuina A parece mediar la lipotoxicidad sobre el adipocito a través de la activación de la ruta TLR4-JNK-NF κ B (Shen *et al.*, 2015).

La fosforilación de StARD10 se asocia a una inhibición de su actividad, por lo que la drástica disminución de la especie fosforilada detectada por nosotros parece indicar que durante la fase temprana de la PA inducida por Cer, la actividad de intercambio de lípidos entre membranas celulares mediado por StARD10 estaría promovido (Olayioye *et al.*, 2007).

Además, como la fluidez de las membranas biológicas, que es esencial para su funcionalidad, está determinada de forma importante por su composición en fosfolípidos (principalmente en fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Coskun *et al.*, 2011), precisamente los fosfolípidos que transporta StAR10), la pérdida de fosforilación en StARD10 podría estar jugando un papel importante en la integridad de las membranas de la célula acinar, cuya perturbación se ha descrito como un mecanismo temprano y relevante en desarrollo de la pancreatitis aguda (Müller *et al.*, 2007), ligado a una mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica (Ferreira *et al.*, 2002).

ARHGAP1 es una proteína de la familia RhoGAPs. En la célula existe una extensa variedad de RhoGAPs, a su vez especializadas en la regulación de todo un catálogo de GTPasas Rho, por lo que se asume que la actividad bioquímica de cada RhoGAP ha de estar regulada de forma muy precisa. Entre los posibles mecanismos de regulación de la actividad GAP, se ha sugerido que la fosforilación desempeña un rol fundamental (Moon and Zheng, 2003), ya sea con efecto potenciador (Haskell *et al.*, 2001; Morishita, Tsutsumi and Ohta, 2015) o inhibidor (Mori *et al.*, 2009). Se ha descrito que la correcta actividad del dominio GAP de p190RhoGAP precisa de la interacción con el extremo N-terminal de la proteína (Tatsis *et al.*, 1998). La fosforilación de la Ser⁵¹ del extremo N-terminal de ARHDAP1 descrita por nosotros podría producir un cambio conformacional en la región N-terminal de ARHGAP1, que afectase a su capacidad de interacción intra o intermolecular. Como no hemos encontrado referencias en la literatura científica acerca de la fosforilación de ARHGAP1, el efecto de esta modificación es hipotético y pudiera afectar tanto a su actividad GAP, como a la actividad de otros dominios de señalización de la proteína.

TPD52 y TPD54 experimentan una reducción en sus niveles de fosforilación durante la fase inicial de la PA inducida por Cer. Un factor característico de la PA experimental es el bloqueo de la secreción de enzimas digestivas del páncreas, considerado un mecanismo fisiopatológico clave para la activación intracelular de los zimógenos (Saluja *et al.*, 2007; Frossard *et al.*, 2008). Se sabe que al menos TP52 se expresa en altas concentraciones en las células acinares pancreáticas [así como en otras células exocrinas con grandes gránulos de secreción] (Groblewski *et al.*, 1999), desde donde regula directamente la secreción de enzimas digestivas dependiente de calcio

(Thomas *et al.*, 2001; Chew *et al.*, 2008). En concreto, se ha demostrado que D52 colocaliza con proteínas de la ruta de secreción en el sistema endolisosómico. La señal de calcio que media la secreción digestiva induce la fosforilación de TPD52 que a su vez regula directamente la exocitosis de LAMP1 (Chew *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010)(Chew *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010).

La hiperestimulación pancreática con secretagogos inhibe la secreción digestiva mediada por VAMP8 (Messenger *et al.*, 2013, 2014), lo que induce la acumulación intracelular de tripsina y la pérdida del compartimento endosómico temprano. La secreción así mediada depende sobre todo de TP52, de forma que en un modelo experimental de PA, se ha descrito que la reducción de la expresión de VAMP8 mediada por TP52 se agrava con el desarrollo de la pancreatitis (Messenger *et al.*, 2017).

La menor fosforilación de las proteínas TPD52 y TPD54, que es necesaria para una correcta secreción de las enzimas digestivas ante la señal de calcio, estaría comprometiendo el tráfico endolisosómico temprano y favoreciendo el bloqueo de la ruta de secreción clásica de las células acinares pancreáticas, ya desde la fase temprana de la PA inducida por Cer. Un dato que llamó nuestra atención fue que el tratamiento con Cer no afectase aparentemente a los niveles de expresión de estas proteínas, tal y como muestran los resultados de LC-MS/MS (información suplementaria de las secciones 3 y 5 de Resultados), y que en el caso de TP54 se confirmó por inmunotransferencia (figura 18). Messenger *et al.* (2017) describieron, en un modelo de pancreatitis experimental en rata más agresivo que el nuestro, que una hora después de inducir la pancreatitis los páncreas extraídos mostraban una significativa disminución de la expresión de TPD52, siendo mucho más pronunciado a las 4 h de la inducción. Puesto que ni LAMP2 ni VAMP8 (que colocalizan con proteínas TPD52 en la ruta de secreción normal y que disminuyen marcadamente en PA) muestran diferencias significativas de expresión 2 h después de inducir la pancreatitis en nuestros animales, parece que la modulación de estos procesos ocurriría mayoritariamente a tiempos más prolongados desde la hiperestimulación.

En definitiva, la regulación negativa del estado de fosforilación de las proteínas TPD52 y TPD54 podría estar reflejando una perturbación la ruta de secreción clásica, que presumiblemente evolucionaría con el desarrollo de la patología.

SOBRE EL USO POTENCIAL COMO BIOMARCADORES DE PROTEÍNAS CON EXPRESIÓN Y/O FOSFORILACIÓN ALTERADAS DESCRITAS EN ESTE TRABAJO

Algunas de las proteínas identificadas en este trabajo, especialmente aquellas proteínas relacionadas directamente con el plasma o las proteínas de secreción, que sufren expresión y/o fosforilación diferencial en nuestro modelo experimental, podrían ser candidatas potenciales a su uso como biomarcadoras en algún aspecto clínico de la PA, y particularmente la PA post-CPRE.

De modo preliminar hemos estudiado el uso potencial de la fetuina A como marcador de la PA post-CPRE. La CPRE es una técnica clínica que se utiliza habitualmente para el diagnóstico y la resolución de la patología biliopancreática. Este procedimiento se asocia a complicaciones (3-10%), siendo la más frecuente la pancreatitis post-CPRE (Wong y Tsai, 2014; Wang, 2017). Los mecanismos fisiopatológicos que disparan la PA post-CPRE y que no se conocen bien, deberían ser similares a los que originan la PA en otras circunstancias. El diagnóstico de la PA post-CPRE, no difiere del de la PA de otras etiologías, siendo los criterios, fundamentalmente, el dolor abdominal y el aumento de los niveles plasmáticos de amilasa. Sin embargo, muchas veces los pacientes sometidos a CPRE, aún con estos síntomas, no desarrollan una pancreatitis (Badalov *et al.*, 2009). Por lo tanto, la identificación de marcadores moleculares sería de gran ayuda para detectar de forma precoz qué pacientes van a desarrollar pancreatitis post-CPRE (junto a otros de pronóstico, predictivos o de seguimiento). Además, el momento de inducción de la pancreatitis post-CPRE, al contrario que otras manifestaciones clínicas de la enfermedad, es conocido, por lo que puede servir como modelo de estudio de las fases iniciales de la PA humana.

Hemos comprobado que los pacientes que desarrollan pancreatitis tras la intervención presentan un mayor nivel de fetuina A plasmática fosforilada, que ya se detecta antes de realizar la CPRE y que se mantiene aproximadamente igual después de la misma. Además, aparece una isoforma más fosforilada, que no se detecta en el grupo control. Puesto que es necesario que la fetuina A esté fosforilada para ejercer su actividad biológica, parece que el incremento en la fosforilación de fetuina A sería un

evento ligado a la respuesta inflamatoria temprana en al menos la PA post-CPRE. Estos datos podrían sugerir que la fosforilación de fetuina A podría usarse como un marcador predictivo, útil para la prevención de la PA al menos en pacientes que se someten a una CPRE. No obstante, dado que la patología biliar (y, de forma destacada, la coledocolitiasis) es uno de los principales factores etiológicos de la PA, existe la posibilidad de que estos pacientes, diagnosticados de PA después de la CPRE, ya hubieran desarrollado una pancreatitis antes de la CPRE, que no sería diagnosticada -en base a los marcadores clásicos de PA- hasta después, por lo que la fosforilación de fetuina A sería un buen candidato como marcador diagnóstico temprano de la patología.

En cualquier caso, aunque los resultados son prometedores, nos encontramos ante datos preliminares basados en un número limitado de muestras, por lo que en un futuro sería necesario profundizar en el estudio con un mayor tamaño muestral.



VI. Conclusiones

1. La caracterización de perfiles de expresión proteica mediante 2-DE en dos fracciones subcelulares de páncreas ha permitido identificar cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y la apoptosis, el estrés oxidativo y las respuestas al estrés, con la generación de energía, el metabolismo celular y procesos de transcripción, con la homeostasis redox, así como en proteasas digestivas e inhibidores de serina proteasas.
2. El incremento en la expresión de LIMP-2 en las células acinares del páncreas es un suceso temprano en el desarrollo de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína, donde las células infiltrantes juegan un papel central. En concreto, los macrófagos, previa activación por los neutrófilos, regulan la expresión de dicha proteína.
3. Las quinasas de estrés JNK y ERK1/2 juegan un papel coordinado en el incremento de los niveles de expresión de LIMP-2 debido a la ceruleína.
4. El análisis proteómico TMT, complementado con técnicas bioinformáticas, nos permitió adscribir las proteínas solubles y asociadas a membrana, diferencialmente expresadas, a diversos mecanismos moleculares como el transporte proteico vesicular, las alteraciones lisosómicas y mitocondriales y la proteólisis. Además, numerosos procesos metabólicos son regulados negativamente, y por el contrario, las respuestas al estrés e inflamatoria están muy desarrolladas.
5. Durante la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína se produce algún tipo de redistribución de los coatómeros COPB y COPG desde las membranas hacia la parte soluble, lo que debe afectar al tráfico proteico.
6. Las PTPs SHP-1, SHP-2 y PTP1B se sobreexpresan, de modo modulado por MAPKs, en el desarrollo temprano de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. JNK actúa previniendo que SHP-1 incremente su expresión por encima de cierto nivel, y modula negativamente a las PTPs con dominios SH2. ERK1/2 es la principal MAPK implicada en el aumento de expresión de SHP-2, y tanto JNK como ERK1/2 juegan un papel en el aumento de expresión de PTP1B.

- 7.** Los niveles elevados de AMPc intracelular suprimen significativamente el incremento de SHP-2 y PTP1B debido a ceruleína.
- 8.** La infiltración por neutrófilos regula el incremento de SHP-2 y PTP1B que produce la ceruleína.
- 9.** Los análisis fosfoproteómicos de proteínas solubles y asociadas a membranas del páncreas mediante 2-DE y análisis proteómico TMT nos han permitido establecer que la fosforilación diferencial afecta principalmente a proteínas relacionadas con la modulación del sistema endolisosómico y del retículo endoplasmático, con el tráfico de proteínas y membranas o la exocitosis, así como con la traducción proteica.
- 10.** La única fosfoproteína con regulación diferencial que se detectó mediante los dos métodos proteómicos fue la fetuina A, cuyo incremento se debe prácticamente en su totalidad a la forma fosforilada.
- 11.** La drástica disminución de los niveles de fosforilación de StARD10 indica que el intercambio de lípidos entre membranas celulares mediado por dicha proteína está promovido durante la fase temprana de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína.
- 12.** La menor fosforilación de las proteínas TPD52 y TPD54 sugiere una disminución del tráfico endolisosómico temprano y participa en el bloqueo de la ruta de secreción clásica de las células acinares pancreáticas.
- 13.** El cambio en el nivel de fosforilación de fetuina A detectado en plasmas humanos, hace que esta proteína sea un candidato prometedor de uso clínico de, al menos, la pancreatitis inducida por CPRE.

1. The characterization of protein expression profiles by 2-DE in two subcellular fractions of the pancreas, led to the identification of changes in the expression of proteins related to inflammation and apoptosis, oxidative stress and responses to stress, energy generation, cell metabolism and transcription processes, and redox homeostasis, as well as in digestive proteases and serine protease inhibitors.
2. The increase in pancreatic acinar cell LIMP-2, is an early event that occur during the development of acute pancreatitis induced by cerulein, with infiltrating cells playing a central role. Specifically, macrophages, upon activation by neutrophils, regulate the expression of LIMP-2.
3. The stress kinases JNK and ERK1/2 play a coordinated role in the increase of LIMP-2 expression due to cerulein.
4. TMT proteomic analyses, complemented with bioinformatic techniques, allowed us to ascribe the differentially expressed soluble and membrane associated proteins, to various molecular mechanisms such as vesicular protein transport, lysosomal and mitochondrial alterations and proteolysis. In addition, numerous metabolic processes are regulated negatively, and on the opposite, stress and inflammatory responses become highly developed.
5. During the early phase of acute pancreatitis induced by cerulein there is some kind of redistribution of the COPB and COPG coatomers from the membranes to the soluble fraction, a feature that must affect protein traffic.
6. PTP species SHP-1, SHP-2 and PTP1B are overexpressed, in a way that is modulated by MAPKs, during the early development of cerulein induced acute pancreatitis. JNK acts by preventing SHP-1 protein expression from increasing beyond a certain level, and negatively modulate the SH2-domain containing PTPs. ERK1/2 is the main MAPK involved in the increase in SHP-2 protein expression, and both JNK and ERK1/2 play a role in the increase in PTP1B protein expression due to cerulein.

- 7.** High levels of intracellular cAMP significantly suppress the increase of SHP-2 and PTP1B protein expression due to cerulein.
- 8.** Neutrophil infiltration regulates the increase of SHP-2 and PTP1B protein expresión due to cerulein.
- 9.** Phosphoproteomic analyses of soluble and membrane-associated proteins of the pancreas by 2-DE and TMT proteomic analysis, led us to establish that differential phosphorylation mainly affects proteins related to the modulation of the endolysosomal system and the endoplasmic reticulum, to protein and membrane traficc, or to exocytosis, as well as to protein translation.
- 10.** Fetuin A was the only differentially regulate phosphoprotein that is detected by the two proteomic methods, and its expression increase is almost entirely due to the phosphorylated form.
- 11.** The dramatic decrease in StARD10 phosphorylation levels indicates that StAR10-mediated lipid exchange among cell membranes is promoted during the early phase of cerulein induced acute pancreatitis.
- 12.** The decrease in the phosphorylation level of TPD52 and TPD54 suggests a decrease in early endolysosomal traffic and participates in the blockage of the classical secretory pathway of pancreatic acinar cells.
- 13.** Changes in the phosphorylation level of fetuin A detected in human plasma makes this protein a promising candidate for clinical use of at least ERCP-induced pancreatitis



VII. Bibliografía

- Agrawal, S.** (2017). Potential prognostic biomarkers in pancreatic juice of resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J. Clin. Oncol.* **8**, 255.
- Aho, H. J., Koskensalo, S. M. and Nevalainen, T. J.** (1980). Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **15**, 411–6.
- Alho, I., Costa, L., Bicho, M. and Coelho, C.** (2013). The role of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP ACP1) in oncogenesis. *Tumor Biol.* **34**, 1979–89.
- Alonso, R., Montero, A., Arévalo, M., García, L. J., Sánchez-Vicente, C., Rodríguez-Nodal, F., López-Novoa, J. M. and Calvo, J. J.** (1994). Platelet-activating factor mediates pancreatic function derangement in caerulein-induced pancreatitis in rats. *Clin. Sci. (Lond).* **87**, 85–90.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T.** (2004). Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* **117**, 699–711.
- Alpy, F. and Tomasetto, C.** (2005). Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J. Cell Sci.* **118**, 2791–2801.
- Auberger, P., Falquerho, L., Contreres, J. O., Pages, G., Le Cam, G., Rossi, B., Le Cam, A., Niall, H., Seeburg, P. H., Chow, E. P., et al.** (1989). Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* **58**, 631–40.
- Babiychuk, E. B., Palstra, R. J., Schaller, J., Kämpfer, U., Draeger, A., Draeger, A. and **** (1999). Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 35191–5.
- Badalov, N., Tenner, S. and Baillie, J.** (2009). The Prevention, recognition and treatment of post-ERCP pancreatitis. *JOP* **10**, 88–97.
- Bettaieb, A., Xi, Y., Hosein, E., Coggins, N., Bachaalany, S., Wiede, F., Perez, S., Griffey, S. M., Sastre, J., Tiganis, T., et al.** (2014). Pancreatic T cell protein-tyrosine phosphatase deficiency ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis. *Cell Commun. Signal.* **12**, 13.
- Bettaieb, A., Koike, S., Chahed, S., Bachaalany, S., Griffey, S., Sastre, J. and Haj, F. G.** (2016). Pancreatic Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deficiency Exacerbates Acute Pancreatitis in Mice. *Am. J. Pathol.* **186**, 2043–54.
- Borta, H., Aroso, M., Rinn, C., Gomez-Lazaro, M., Vitorino, R., Zeuschner, D., Grabenbauer, M., Amado, F. and Schrader, M.** (2010). Analysis of low abundance membrane-associated proteins from rat pancreatic zymogen granules. *J. Proteome Res.* **9**, 4927–39.
- Boucher, M. J., Duchesne, C., Lainé, J., Morisset, J. and Rivard, N.** (2001). cAMP protection of pancreatic cancer cells against apoptosis induced by ERK inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 207–16.
- Bourdeau, A., Dubé, N. and Tremblay, M. L.** (2005). Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 203–9.
- Boutros, R., Fanayan, S., Shehata, M. and Byrne, J. A.** (2004). The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1115–21.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–54.

- Bragado, M. J., Sánchez-Bernal, C., García, L. J., López, M. A., San Román, J. I. and Calvo, J. J.** (1998). Effect of high fiber intake on pancreatic lysosomal stability in ethanol-fed rats. This study has been supported by a grant from Junta de Castilla y León. *J. Nutr. Biochem.* **9**, 164–9.
- Braun, R. J., Kinkl, N., Beer, M. and Ueffing, M.** (2007). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1033–45.
- Byrne, J. A., Mattei, M.-G. and Basset, P.** (1996). Definition of the Tumor Protein D52 (TPD52) Gene Family through Cloning of D52 Homologues in Human (hD53) and Mouse (mD52). *Genomics* **35**, 523–32.
- Byrne, J. A., Nourse, C. R., Basset, P. and Gunning, P.** (1998). Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system. *Oncogene* **16**, 873–81.
- Carrasco-Marín, E., Fernández-Prieto, L., Rodríguez-Del Río, E., Madrazo-Toca, F., Reinheckel, T., Saftig, P. and Alvarez-Dominguez, C.** (2011). LIMP-2 links late phagosomal trafficking with the onset of the innate immune response to *Listeria monocytogenes*: a role in macrophage activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 3332–41.
- Casado, P., Hijazi, M., Britton, D. and Cutillas, P. R.** (2017). Impact of phosphoproteomics in the translation of kinase-targeted therapies. *Proteomics* **17**, 1600235.
- Chan, Y. C. and Leung, P. S.** (2007). Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* **34**, 1–14.
- Chen, S.-L., Zhang, X.-K., Halverson, D. O., Byeon, M. K., Schweinfest, C. W., Ferris, D. K. and Bhat, N. K.** (1997). Characterization of human N8 protein. *Oncogene* **15**, 2577–88.
- Chen, X., Li, C., Izumi, T., Ernst, S. A., Andrews, P. C. and Williams, J. A.** (2004). Rab27b localizes to zymogen granules and regulates pancreatic acinar exocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 1157–62.
- Chen, X., Walker, A. K., Strahler, J. R., Simon, E. S., Tomanicek-Volk, S. L., Nelson, B. B., Hurley, M. C., Ernst, S. A., Williams, J. A. and Andrews, P. C.** (2006). Organellar Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 306–12.
- Chen, R., Pan, S., Cooke, K., Moyes, K. W., Bronner, M. P., Goodlett, D. R., Aebbersold, R. and Brentnall, T. A.** (2007). Comparison of pancreas juice proteins from cancer versus pancreatitis using quantitative proteomic analysis. *Pancreas* **34**, 70–9.
- Chew, C. S., Chen, X., Zhang, H., Berg, E. A. and Zhang, H.** (2008). Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation of tumor protein D52 on serine residue 136 may be mediated by CAMK2delta6. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G1159-72.
- Chiari, H.** (1896). About the digestion of the human pancreas (in German). *Zeitschrift für Heilkunde.* **17**, 69–96.
- Clemons, A. P., Holstein, D. M., Galli, A. and Saunders, C.** (2002). Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059. *Pancreas* **25**, 251–9.
- Cohen, P.** (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5001–10.
- Coskun, U., Simons, K., Vidal-Puig, A., Oresic, M., Brandt, U., Greenberg, M. L., Schägger, H.,**

- Simons, K., Proszynski, T. J., Shevchenko, A., et al.** (2011). Cell membranes: the lipid perspective. *Structure* **19**, 1543–8.
- Cuervo, A. M. and Dice, J. F.** (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* **273**, 501–3.
- Cuervo, A. M. and Dice, J. F.** (1998). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med. (Berl)*. **76**, 6–12.
- Dayon, L. and Sanchez, J.-C.** (2012). Relative Protein Quantification by MS/MS Using the Tandem Mass Tag Technology. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 115–27.
- de Duve, C.** (1983). Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* **137**, 391–7.
- Dumont, F. J.** (2000). FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr. Med. Chem.* **7**, 731–48.
- Engholm-Keller, K. and Larsen, M. R.** (2013). Technologies and challenges in large-scale phosphoproteomics. *Proteomics* **13**, 910–31.
- Escobar, J., Pereda, J., López-Rodas, G. and Sastre, J.** (2012). Redox signaling and histone acetylation in acute pancreatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 819–37.
- Eskelinen, E.-L., Illert, A. L., Tanaka, Y., Schwarzmann, G., Blanz, J., Von Figura, K. and Saftig, P.** (2002). Role of LAMP-2 in Lysosome Biogenesis and Autophagy. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3355–68.
- Eskelinen, E.-L., Tanaka, Y. and Saftig, P.** (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* **13**, 137–45.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–35.
- Fang, Y., Zhang, Q., Wang, X., Yang, X., Wang, X., Huang, Z., Jiao, Y. and Wang, J.** (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals genistein as a modulator of cell cycle and DNA damage response pathways in triple-negative breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **48**, 1016–28.
- Faust, F., Gomez-Lazaro, M., Borta, H., Agricola, B. and Schrader, M.** (2008). Rab8 is involved in zymogen granule formation in pancreatic acinar AR42J cells. *Traffic* **9**, 964–79.
- Feick, P., Gilhaus, S., Blum, R., Hofmann, F., Just, I. and Schulz, I.** (1999). Inhibition of amylase secretion from differentiated AR4-2J pancreatic acinar cells by an actin cytoskeleton controlled protein tyrosine phosphatase activity. *FEBS Lett.* **451**, 269–74.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M.** (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71.
- Ferreira, L., Pérez-González, N., Llanillo, M., Calvo, J. J. and Sánchez-Bernal, C.** (2002). Acute pancreatitis decreases pancreas phospholipid levels and increases susceptibility to lipid peroxidation in rat pancreas. *Lipids* **37**, 167–71.
- Fétaud, V., Frossard, J.-L., Farina, A., Pastor, C. M., Bühler, L., Dumonceau, J.-M., Hadengue, A., Hochstrasser, D. F. and Lescuyer, P.** (2008). Proteomic profiling in an animal model of acute pancreatitis. *Proteomics* **8**, 3621–31.
- Fétaud-Lapierre, V., Pastor, C. M., Farina, A., Hochstrasser, D. F., Frossard, J.-L. and Lescuyer, P.** (2010). Proteomic Analysis of Heat Shock-Induced Protection in Acute Pancreatitis. *J. Proteome Res.* **9**, 5929–42.

- Fétaud-Lapierre, V., Pastor, C. M., Jorge-Costa, M., Hochstrasser, D. F., Morel, D. R., Frossard, J.-L. and Lescuyer, P. (2013). Time-course proteomic analysis of taurocholate-induced necrotizing acute pancreatitis. *J. Proteomics* **85**, 12–27.
- Forsmark, C. E., Baillie, J., AGA Institute Clinical Practice and Economics Committee and AGA Institute Governing Board (2007). AGA Institute Technical Review on Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **132**, 2022–44.
- Fortunato, F. and Kroemer, G. (2009). Impaired autophagosome-lysosome fusion in the pathogenesis of pancreatitis. *Autophagy* **5**, 850–3.
- Fortunato, F., Bürgers, H., Bergmann, F., Rieger, P., Büchler, M. W., Kroemer, G. and Werner, J. (2009). Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, and necrosis in pancreatitis. *Gastroenterology* **137**, 350–60, 360–5.
- Frangioni, J. V, Oda, A., Smith, M., Salzman, E. W. and Neel, B. G. (1993). Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.* **12**, 4843–56.
- Frossard, J.-L., Steer, M. L., Pastor, C. M., Hilgers, R. and Creutzfeld, W. (2008). Acute pancreatitis. *Lancet (London, England)* **371**, 143–52.
- Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himeno, M. and Kato, K. (1991). Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 444–52.
- Fukuda, M. (1991). Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **266**, 21327–30.
- Gerasimenko, J. V, Peng, S., Tsugorka, T. and Gerasimenko, O. V (2017). Ca(2+) signalling underlying pancreatitis. *Cell Calcium*. Publicado *on line*. doi: 10.1016/j.ceca.2017.05.010.
- Gloor, B., Blinman, T. A., Rigberg, D. A., Todd, K. E., Lane, J. S., Hines, O. J. and Reber, H. A. (2000). Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* **21**, 414–20.
- Gonzalez, A., Valeiras, M., Sidransky, E. and Tayebi, N. (2014). Lysosomal integral membrane protein-2: a new player in lysosome-related pathology. *Mol. Genet. Metab.* **111**, 84–91.
- Groblewski, G. E., Yoshida, M., Yao, H., Williams, J. A. and Ernst, S. A. (1999). Immunolocalization of CRHSP28 in exocrine digestive glands and gastrointestinal tissues of the rat. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **276**, G219-26.
- Groen, A., Lemeer, S., van der Wijk, T., Overvoorde, J., Heck, A. J. R., Ostman, A., Barford, D., Slijper, M. and den Hertog, J. (2005). Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **280**, 10298–304.
- Guerrier, L., Righetti, P. G. and Boschetti, E. (2008). Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library. *Nat. Protoc.* **3**, 883–90.
- Guillaumes, S., Blanco, I., Villanueva, A., Sans, M. D., Clavé, P., Chabás, A., Farré, A. and Lluís, F. (1996). [Activity and subcellular distribution of lysosomal enzymes in acute pancreatitis induced by CDE diet in mice]. *Gastroenterol. Hepatol.* **19**, 146–52.
- Gupte, A. R. and Forsmark, C. E. (2014). Chronic pancreatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **30**, 500–5.

- Haglund, A. C., Ek, B. and Ek, P. (2001). Phosphorylation of human plasma alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo. *Biochem. J.* **357**, 437–45.
- Halder, S. K., Anumanthan, G., Maddula, R., Mann, J., Chytil, A., Gonzalez, A. L., Washington, M. K., Moses, H. L., Beauchamp, R. D. and Datta, P. K. (2006). Oncogenic Function of a Novel WD-Domain Protein, STRAP, in Human Carcinogenesis. *Cancer Res.* **66**, 6156–66.
- Hanash, S. (2003). Disease proteomics. *Nature* **422**, 226–32.
- Hashimoto, D., Ohmuraya, M., Hirota, M., Yamamoto, A., Suyama, K., Ida, S., Okumura, Y., Takahashi, E., Kido, H., Araki, K., et al. (2008). Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J. Cell Biol.* **181**, 1065–72.
- Haskell, M. D., Nickles, A. L., Agati, J. M., Su, L., Dukes, B. D. and Parsons, S. J. (2001). Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. *J. Cell Sci.* **114**, 1699–708.
- Hegy, P., Perides, G., Steer, M. L. and Rakonczay, Z. (2013). Commonly Employed Rodent Models of Experimental Acute Pancreatitis: Their Strengths and Weaknesses, Relevance to Human Disease, Selection, and Appropriate Use. *The Pancreapedia* **April 18**, [DOI: 10.3998/panc.2013.4]
- Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., Martín-Valmaseda, E. M. and Llanillo, M. (1999). Oxidative inactivation of human and sheep platelet membrane-associated phosphotyrosine phosphatase activity. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1218–30.
- Hochstrasser, D. F., Harrington, M. G., Hochstrasser, A. C., Miller, M. J. and Merrill, C. R. (1988). Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* **173**, 424–35.
- Höfken, T., Linder, D., Kleene, R., Göke, B. and Wagner, A. C. (1998). Membrane dipeptidase and glutathione are major components of pig pancreatic zymogen granules. *Exp. Cell Res.* **244**, 481–90.
- Höfken, T., Keller, N., Fleischer, F., Göke, B. and Wagner, A. C. (2000). Map kinase phosphatases (MKP's) are early responsive genes during induction of cerulein hyperstimulation pancreatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 680–5.
- Horibata, Y. and Sugimoto, H. (2010). StarD7 Mediates the Intracellular Trafficking of Phosphatidylcholine to Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **285**, 7358–65.
- Hu, L., Evers, S., Lu, Z. H., Shen, Y. and Chen, J. (2004). Two-dimensional protein database of human pancreas. *Electrophoresis* **25**, 512–18.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57.
- Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* **50**, 823–9.
- Hunter, T. (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **353**, 583–605.
- Hunziker, W. and Geuze, H. J. (1996). Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays* **18**, 379–89.

- Isenmann, R. and Beger, H. G.** (1999). Natural history of acute pancreatitis and the role of infection. *Baillieres. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **13**, 291–301.
- Ji, B., Chen, X., Misek, D. E., Kuick, R., Hanash, S., Ernst, S., Najarian, R. and Logsdon, C. D.** (2003). Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. *Physiol. Genomics* **14**, 59–72.
- Jia, Z., Barford, D., Flint, A. J. and Tonks, N. K.** (1995). Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **268**, 1754–8.
- Johnson, L. N. and Lewis, R. J.** (2001). Structural Basis for Control by Phosphorylation. *Chem Rev.* **101**, 2209–42.
- Johnstone, C. N., Castellví-Bel, S., Chang, L. M., Bessa, X., Nakagawa, H., Harada, H., Sung, R. K., Piqué, J. M., Castells, A. and Rustgi, A. K.** (2004). ARHGAP8 is a novel member of the RHOGAP family related to ARHGAP1/CDC42GAP/p50RHOGAP: mutation and expression analyses in colorectal and breast cancers. *Gene* **336**, 59–71.
- Jung, H., Seong, H.-A., Manoharan, R. and Ha, H.** (2010). Serine-threonine kinase receptor-associated protein inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 function through direct interaction. *J. Biol. Chem.* **285**, 54–70.
- Jungblut, P., Thiede, B., Zimny-Arndt, U., Müller, E.-C., Scheler, C., Wittmann-Liebold, B. and Otto, A.** (1996). Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis* **17**, 839–47.
- Kalabay, L., Mathur, S., Bobin, S. and Arnaud, P.** (1996). Electrophoretic and isoelectric focusing analysis of human recombinant alpha 2-HS glycoprotein produced in insect cells: analysis of the post-translational events. *Electrophoresis* **17**, 529–32.
- Karas, M. and Hillenkamp, F.** (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–301.
- Karlsson-Rosenthal, C. and Millar, J. B. A.** (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* **16**, 285–92.
- Kartberg, F., Asp, L., Dejgaard, S. Y., Smedh, M., Fernandez-Rodriguez, J., Nilsson, T. and Presley, J. F.** (2010). ARFGAP2 and ARFGAP3 are essential for COPI coat assembly on the Golgi membrane of living cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 36709–20.
- Kellermann, J., Haupt, H., Auerswald, E. A. and Müller-Ester, W.** (1989). The arrangement of disulfide loops in human alpha 2-HS glycoprotein. Similarity to the disulfide bridge structures of cystatins and kininogens. *J. Biol. Chem.* **264**, 14121–8.
- Kemppainen, E., Hietaranta, A., Puolakkainen, P., Hedström, J., Haapiainen, R. and Stenman, U. H.** (2000). Time course profile of serum trypsinogen-2 and trypsin-2-alpha1-antitrypsin in patients with acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**, 1216–20.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. and Koike, T.** (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 749–57.
- Klein, E., Klein, J. B. and Thongboonkerd, V.** (2004). Two-dimensional gel electrophoresis: a fundamental tool for expression proteomics studies. *Contrib. Nephrol.* **141**, 25–39.
- Kontaridis, M. I., Eminaga, S., Fornaro, M., Zito, C. I., Sordella, R., Settleman, J. and Bennett, A. M.** (2004). SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5340–52.

- Kornfeld, S. and Mellman, I.** (1989). The Biogenesis of Lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483–525.
- Krüger, B., Albrecht, E. and Lerch, M. M.** (2000). The Role of Intracellular Calcium Signaling in Premature Protease Activation and the Onset of Pancreatitis. *Am. J. Pathol.* **157**, 43–50.
- Kuśnierz-Cabala, B., Gurda-Duda, A., Panek, J., Fedak, D., Dumnicka, P., Solnica, B. and Kulig, J.** (2010). Serum fetuin A concentrations in patients with acute pancreatitis. *Clin. Lab.* **56**, 191–5.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- Lahiry, P., Torkamani, A., Schork, N. J. and Hegele, R. A.** (2010). Kinase mutations in human disease: interpreting genotype?phenotype relationships. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 60–74.
- Lampel, M. and Kern, H. F.** (1977). Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.* **373**, 97–117.
- Lankisch, P. G., Apte, M. and Banks, P. A.** (2015). Acute pancreatitis. *Lancet (London, England)* **386**, 85–96.
- Lassout, O., Pastor, C. M., Fétaud-Lapierre, V., Hochstrasser, D. F., Frossard, J.-L. and Lescuyer, P.** (2010). Analysis of the pancreatic low molecular weight proteome in an animal model of acute pancreatitis. *J. Proteome Res.* **9**, 4535–44.
- Le Cam, A., Magnaldo, I., Le Cam, G. and Auberger, P.** (1985). Secretion of a major phosphorylated glycoprotein by hepatocytes. Characterization of specific antibodies and investigations of the processing, excretion kinetics, and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **260**, 15965–71.
- Lee, C. C., Bowman, B. H. and Yang, F. M.** (1987). Human alpha 2-HS-glycoprotein: the A and B chains with a connecting sequence are encoded by a single mRNA transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 4403–7.
- Lee, J., Seo, J. H., Lim, J. W. and Kim, H.** (2010). Membrane proteome analysis of cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: implication for early event of acute pancreatitis. *Gut Liver* **4**, 84–93.
- Lee, D. H. K., Gan, P.-Y., Katerelos, M., Fraser, S. A., Gleich, K., Holdsworth, S. R. and Power, D. A.** (2014). Absence of the lysosomal protein Limp-2 attenuates renal injury in crescentic glomerulonephritis. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 400–8.
- Lempinen, M., Stenman, U.-H., Halttunen, J., Puolakkainen, P., Haapiainen, R. and Kemppainen, E.** (2005). Early sequential changes in serum markers of acute pancreatitis induced by endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Pancreatology* **5**, 157–64.
- Lerch, M. M. and Gorelick, F. S.** (2000). Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Med. Clin. North Am.* **84**, 549–63, viii.
- Lerch, M. M., Lutz, M. P., Weidenbach, H., Müller-Pillasch, F., Gress, T. M., Leser, J. and Adler, G.** (1997). Dissociation and reassembly of adherens junctions during experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* **113**, 1355–66.
- Levine, B. and Kroemer, G.** (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132**, 27–42.
- Li, Z., Lu, M., Chu, J., Qiao, X., Meng, X., Sun, B., Zhang, W. and Xue, D.** (2012). Early proteome analysis of rat pancreatic acinar AR42J cells treated with tauro lithocholic acid 3-sulfate.

- Pancreatology* **12**, 248–56.
- Lippai, M. and Szatmári, Z.** (2017). Autophagy-from molecular mechanisms to clinical relevance. *Cell Biol. Toxicol.* **33**, 145–68.
- Lopez-Serra, P., Marcilla, M., Villanueva, A., Ramos-Fernandez, A., Palau, A., Leal, L., Wahi, J. E., Setien-Baranda, F., Szczesna, K., Moutinho, C., et al.** (2014). A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nat. Commun.* **5**, 3608.
- Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., Lokamani, I., Yaoita, E. and Yamamoto, T.** (2014). Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin. Proteomics* **11**, 16.
- Malini, E., Zampieri, S., Deganuto, M., Romanello, M., Sechi, A., Bembi, B. and Dardis, A.** (2015). Role of LIMP-2 in the intracellular trafficking of β -glucosidase in different human cellular models. *FASEB J.* **29**, 3839–52.
- Mann, M., Hendrickson, R. C. and Pandey, A.** (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 437–73.
- Mareninova, O. A., Hermann, K., French, S. W., O’Konski, M. S., Pandol, S. J., Webster, P., Erickson, A. H., Katunuma, N., Gorelick, F. S., Gukovsky, I., et al.** (2009). Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **119**, 3340–55.
- Mathews, S. T., Srinivas, P. R., Leon, M. A. and Grunberger, G.** (1997). Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase. *Life Sci.* **61**, 1583–92.
- Mathews, S. T., Chellam, N., Srinivas, P. R., Cintron, V. J., Leon, M. A., Goustin, A. S. and Grunberger, G.** (2000). Alpha2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **164**, 87–98.
- Matsui, I., Hamano, T., Mikami, S., Fujii, N., Takabatake, Y., Nagasawa, Y., Kawada, N., Ito, T., Rakugi, H., Imai, E., et al.** (2009). Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure. *Kidney Int.* **75**, 915–28.
- Mayerle, J., Schnekenburger, J., Krüger, B., Kellermann, J., Ruthenbürger, M., Weiss, F. U., Nalli, A., Domschke, W. and Lerch, M. M.** (2005). Extracellular Cleavage of E-Cadherin by Leukocyte Elastase During Acute Experimental Pancreatitis in Rats. *Gastroenterology* **129**, 1251–67.
- Mayerle, J., Sandler, M. and Lerch, M. M.** (2013). Secretagogue (Caerulein) induced pancreatitis in rodents. *The Pancreapedia* February 6, [DOI: 10.3998/panc.2013.2].
- Messenger, S. W., Thomas, D. D. H., Falkowski, M. A., Byrne, J. A., Gorelick, F. S. and Groblewski, G. E.** (2013). Tumor protein D52 controls trafficking of an apical endolysosomal secretory pathway in pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **305**, G439-52.
- Messenger, S. W., Falkowski, M. A., Thomas, D. D. H., Jones, E. K., Hong, W., Gaisano, H. Y., Giasano, H. Y., Boulis, N. M. and Groblewski, G. E.** (2014). Vesicle associated membrane protein 8 (VAMP8)-mediated zymogen granule exocytosis is dependent on endosomal trafficking via the constitutive-like secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **289**, 28040–53.
- Messenger, S. W., Jones, E. K., Holthaus, C. L., Thomas, D. D. H., Cooley, M. M., Byrne, J. A., Mareninova, O. A., Gukovskaya, A. S. and Groblewski, G. E.** (2017). Acute acinar pancreatitis blocks vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8)-dependent secretion,

- resulting in intracellular trypsin accumulation. *J. Biol. Chem.* **292**, 7828–39.
- Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D. and Thomas, P. D.** (2017). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* **45**, D183–89.
- Minutoli, L., Altavilla, D., Marini, H., Passaniti, M., Bitto, A., Seminara, P., Venuti, F. S., Famulari, C., Macri, A., Versaci, A., et al.** (2004). Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis. *Life Sci.* **75**, 2853–66.
- Moon, S. Y. and Zheng, Y.** (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* **13**, 13–22.
- Mori, K., Amano, M., Takefuji, M., Kato, K., Morita, Y., Nishioka, T., Matsuura, Y., Murohara, T. and Kaibuchi, K.** (2009). Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *J. Biol. Chem.* **284**, 5067–76.
- Morishita, Y., Tsutsumi, K. and Ohta, Y.** (2015). Phosphorylation of Serine 402 Regulates RacGAP Protein Activity of FilGAP Protein. *J. Biol. Chem.* **290**, 26328–38.
- Müller, T., Choidas, A., Reichmann, E. and Ullrich, A.** (1999). Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J. Biol. Chem.* **274**, 10173–83.
- Müller, M. W., McNeil, P. L., Büchler, P., Ceyhan, G. O., Wolf-Hieber, E., Adler, G., Beger, H. G., Büchler, M. W. and Friess, H.** (2007). Acinar cell membrane disruption is an early event in experimental acute pancreatitis in rats. *Pancreas* **35**, e30-40.
- Namkung, W., Yoon, J. S., Kim, K. H. and Lee, M. G.** (2008). PAR2 exerts local protection against acute pancreatitis via modulation of MAP kinase and MAP kinase phosphatase signaling. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G886-94.
- Nathan, C.** (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–82.
- Neel, B. G. and Tonks, N. K.** (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 193–204.
- Neel, B. G., Gu, H. and Pao, L.** (2003). The “Shp”ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 284–93.
- Nixon, R. A., Yang, D.-S. and Lee, J.-H.** (2008). Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* **4**, 590–9.
- Nourse, C. R., Mattei, M.-G., Gunning, P. and Byrne, J. A.** (1998). Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1443**, 155–68.
- Ohashi, S., Nishio, A., Nakamura, H., Kido, M., Ueno, S., Uza, N., Inoue, S., Kitamura, H., Kiriya, K., Asada, M., et al.** (2006). Protective roles of redox-active protein thioredoxin-1 for severe acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G772-81.
- Ohnishi, T., Nakamura, O., Arakaki, N. and Daikuhara, Y.** (1997). Effect of phosphorylated rat fetuin on the growth of hepatocytes in primary culture in the presence of human hepatocyte-growth factor. Evidence that phosphorylated fetuin is a natural modulator of hepatocyte-growth factor. *Eur. J. Biochem.* **243**, 753–61.

- Olayioye, M. A., Vehring, S., Müller, P., Herrmann, A., Schiller, J., Thiele, C., Lindeman, G. J., Visvader, J. E. and Pomorski, T. (2005). StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 27436–42.
- Olayioye, M. A., Buchholz, M., Schmid, S., Schöffler, P., Hoffmann, P. and Pomorski, T. (2007). Phosphorylation of StarD10 on serine 284 by casein kinase II modulates its lipid transfer activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 22492–8.
- Olsen, J. V., Ong, S.-E. and Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 608–14.
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M., Kane, D. W., Reinhold, W. C., Lababidi, S., et al. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell* **127**, 635–48.
- Pao, L. I., Badour, K., Siminovitch, K. A. and Neel, B. G. (2007). Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 473–523.
- Pastor, C. M., Vonlaufen, A., Georgi, F., Hadengue, A., Morel, P. and Frossard, J.-L. (2006). Neutrophil depletion—but not prevention of Kupffer cell activation—decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **12**, 1219–24.
- Patterson, S. D. and Aebersold, R. H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* **33**, 311–23.
- Pérez-Sotelo, D., Roca-Rivada, A., Larrosa-García, M., Castelao, C., Baamonde, I., Baltar, J., Crujeiras, A. B., Seoane, L. M., Casanueva, F. F. and Pardo, M. (2017). Visceral and subcutaneous adipose tissue express and secrete functional alpha2hsglycoprotein (fetuin a) especially in obesity. *Endocrine* **55**, 435–46.
- Persson, C., Sävenhed, C., Bourdeau, A., Tremblay, M. L., Markova, B., Böhmer, F. D., Haj, F. G., Neel, B. G., Elson, A., Heldin, C.-H., et al. (2004). Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2190–201.
- Pescador, R., Manso, M. A., Rebollo, A. J. and de Dios, I. (1995). Effect of chronic administration of hydrocortisone on the induction and evolution of acute pancreatitis induced by cerulein. *Pancreas* **11**, 165–72.
- Peters, C. and von Figura, K. (1994). Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett.* **346**, 108–14.
- Proux, V., Provot, S., Felder-Schmittbuhl, M. P., Laugier, D., Calothy, G. and Marx, M. (1996). Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 30790–7.
- Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Callebaut, I., Mikhailik, A., Calothy, G. and Marx, M. (2003). D53 is a novel endosomal SNARE-binding protein that enhances interaction of syntaxin 1 with the synaptobrevin 2 complex in vitro. *Biochem. J.* **370**, 213–21.
- Qu, C.-K. (2002). Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 297–301.
- Rabilloud, T., Valette, C. and Lawrence, J. J. (1994). Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **15**, 1552–8.

- Ramos-Fernández, A., Paradela, A., Navajas, R. and Albar, J. P. (2008). Generalized method for probability-based peptide and protein identification from tandem mass spectrometry data and sequence database searching. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1748–54.
- Rau, B. M., Krüger, C. M., Hasel, C., Oliveira, V., Rubie, C., Beger, H. G. and Schilling, M. K. (2006). Effects of immunosuppressive and immunostimulative treatment on pancreatic injury and mortality in severe acute experimental pancreatitis. *Pancreas* **33**, 174–83.
- Reisinger, V. and Eichacker, L. A. (2006). Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native PAGE. *Proteomics* **6**, 6–15.
- Righetti, P. G. (2004). Bioanalysis: Its past, present, and some future. *Electrophoresis* **25**, 2111–27.
- Rindler, M. J., Xu, C.-F., Gumper, I., Smith, N. N. and Neubert, T. A. (2007). Proteomic analysis of pancreatic zymogen granules: identification of new granule proteins. *J. Proteome Res.* **6**, 2978–92.
- Rivard, N., Rydzewska, G., Lods, J. S., Martinez, J. and Morisset, J. (1994). Pancreas growth, tyrosine kinase, PtdIns 3-kinase, and PLD involve high-affinity CCK-receptor occupation. *Am. J. Physiol.* **266**, G62-70.
- Rivard, N., Rydzewska, G., Lods, J. S. and Morisset, J. (1995). Novel model of integration of signaling pathways in rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* **269**, G352-62.
- Roberts, S. E., Akbari, A., Thorne, K., Atkinson, M. and Evans, P. A. (2013). The incidence of acute pancreatitis: impact of social deprivation, alcohol consumption, seasonal and demographic factors. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **38**, 539–48.
- Roux, P. P. and Thibault, P. (2013). The Coming of Age of Phosphoproteomics—from Large Data Sets to Inference of Protein Functions. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3453–64.
- Ruddraraju, K. V. and Zhang, Z.-Y. (2017). Covalent inhibition of protein tyrosine phosphatases. *Mol. Biosyst.* **13**, 1257–79.
- Saftig, P. and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 623–35.
- Saluja, A., Hashimoto, S., Saluja, M., Powers, R. E., Meldolesi, J. and Steer, M. L. (1987). Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol.* **253**, G508-16.
- Saluja, A. K., Saluja, M., Printz, H., Zaverchnik, A., Sengupta, A. and Steer, M. L. (1989). Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 8968–71.
- Saluja, A. K., Lerch, M. M., Phillips, P. A. and Dudeja, V. (2007). Why Does Pancreatic Overstimulation Cause Pancreatitis? *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 249–69.
- Sánchez-Bernal, C., García-Morales, O. H., Domínguez, C., Martín-Gallán, P., Calvo, J. J., Ferreira, L. and Pérez-González, N. (2004). Nitric oxide protects against pancreatic subcellular damage in acute pancreatitis. *Pancreas* **28**, e9-15.
- Sandoval, I. V., Arredondo, J. J., Alcalde, J., Gonzalez Noriega, A., Vandekerckhove, J., Jimenez, M. A. and Rico, M. (1994). The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 6622–31.

- Saraswat, M., Joenväärä, S., Seppänen, H., Mustonen, H., Haglund, C. and Renkonen, R. (2017). Comparative proteomic profiling of the serum differentiates pancreatic cancer from chronic pancreatitis. *Cancer Med.* **6**, 1738–51.
- Sarmiento, N., Sánchez-Bernal, C., Ayra, M., Pérez, N., Hernández-Hernández, A., Calvo, J. J. and Sánchez-Yagüe, J. (2008). Changes in the expression and dynamics of SHP-1 and SHP-2 during cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 271–9.
- Sarmiento, N., Sánchez-Bernal, C., Pérez, N., Sardina, J. L., Mangas, A., Calvo, J. J. and Sánchez-Yagüe, J. (2010). Rolipram and SP600125 Suppress the Early Increase in PTP1B Expression During Cerulein-Induced Pancreatitis in Rats. *Pancreas* **39**, 639–45.
- Sarmiento, N., Sánchez-Yagüe, J., Juanes, P. P., Pérez, N., Ferreira, L., García-Hernández, V., Mangas, A., Calvo, J. J. and Sánchez-Bernal, C. (2011). Changes in the morphology and lability of lysosomal subpopulations in cerulein-induced acute pancreatitis. *Dig. Liver Dis.* **43**, 132–38.
- Sathasivam, P., Bailey, A. M., Crossley, M. and Byrne, J. A. (2001). The Role of the Coiled-Coil Motif in Interactions Mediated by TPD52. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 56–61.
- Sato, T., Otaka, M., Odashima, M., Kato, S., Jin, M., Konishi, N., Matsushashi, T. and Watanabe, S. (2006). Specific type IV phosphodiesterase inhibitor ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 339–44.
- Satoh, A., Shimosegawa, T., Satoh, K., Ito, H., Kohno, Y., Masamune, A., Fujita, M. and Toyota, T. (2000a). Activation of adenosine A1-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats. *Gastroenterology* **119**, 829–36.
- Satoh, A., Shimosegawa, T., Satoh, K., Ito, H., Kohno, Y., Masamune, A., Fujita, M., Toyota, T., Toyooka, T. and Omata, M. (2000b). Activation of adenosine A1-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats. *Gastroenterology* **119**, 829–36.
- Schnekenburger, J., Mayerle, J., Krüger, B., Buchwalow, I., Weiss, F. U., Albrecht, E., Samoilova, V. E., Domschke, W. and Lerch, M. M. (2005). Protein tyrosine phosphatase kappa and SHP-1 are involved in the regulation of cell-cell contacts at adherens junctions in the exocrine pancreas. *Gut* **54**, 1445–55.
- Semmler, J., Wachtel, H. and Endres, S. (1993). The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses tumor necrosis factor-alpha production by human mononuclear cells. *Int. J. Immunopharmacol.* **15**, 409–13.
- Shaw, M. M. and Riederer, B. M. (2003). Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3**, 1408–17.
- Shen, X., Yang, L., Yan, S., Zheng, H., Liang, L., Cai, X. and Liao, M. (2015). Fetuin A promotes lipotoxicity in β cells through the TLR4 signaling pathway and the role of pioglitazone in anti-lipotoxicity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **412**, 1–11.
- Shih, H.-J., Chen, H.-H., Chen, Y.-A., Wu, M.-H., Liou, G.-G., Chang, W.-W., Chen, L., Wang, L.-H. and Hsu, H.-L. (2012). Targeting MCT-1 oncogene inhibits Shc pathway and xenograft tumorigenicity. *Oncotarget* **3**, 1401–15.
- Sindhu, S., Akhter, N., Shenouda, S., Wilson, A. and Ahmad, R. (2016). Plasma fetuin-A/ α 2-HS-glycoprotein correlates negatively with inflammatory cytokines, chemokines and activation biomarkers in individuals with type-2 diabetes. *BMC Immunol.* **17**, 33.
- Singh, P. and Garg, P. K. (2016). Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current

- understanding. *Indian J. Gastroenterol.* **35**, 153–66.
- Smith, E. R., Ford, M. L., Tomlinson, L. A., Rajkumar, C., McMahon, L. P. and Holt, S. G.** (2012). Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 1957–66.
- Smith, E. R., Hanssen, E., McMahon, L. P. and Holt, S. G.** (2013). Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One* **8**, e60904.
- Song, L., Wang, F., Dong, Z., Hua, X. and Xia, Q.** (2017). Label-free quantitative phosphoproteomic profiling of cellular response induced by an insect cytokine paralytic peptide. *J. Proteomics* **154**, 49–58.
- Srinivas, P. R., Deutsch, D. D., Mathews, S. T., Goustin, A. S., Leon, M. A. and Grunberger, G.** (1996). Recombinant human alpha 2-HS glycoprotein inhibits insulin-stimulated mitogenic pathway without affecting metabolic signalling in Chinese hamster ovary cells overexpressing the human insulin receptor. *Cell. Signal.* **8**, 567–73.
- Steer, M. L. and Meldolesi, J.** (1988). Pathogenesis of acute pancreatitis. *Annu. Rev. Med.* **39**, 95–105.
- Szczur, K., Xu, H., Atkinson, S., Zheng, Y. and Filippi, M.-D.** (2006). Rho GTPase CDC42 regulates directionality and random movement via distinct MAPK pathways in neutrophils. *Blood* **108**, 4205–13.
- Takahashi, K., Mashima, H., Miura, K., Maeda, D., Goto, A., Goto, T., Sun-Wada, G.-H., Wada, Y. and Ohnishi, H.** (2017). Disruption of Small GTPase Rab7 Exacerbates the Severity of Acute Pancreatitis in Experimental Mouse Models. *Sci. Rep.* **7**, 2817.
- Takata, H., Ikeda, Y., Suehiro, T., Ishibashi, A., Inoue, M., Kumon, Y. and Terada, Y.** (2009). High glucose induces transactivation of the alpha2-HS glycoprotein gene through the ERK1/2 signaling pathway. *J. Atheroscler. Thromb.* **16**, 448–56.
- Tatsis, N., Lannigan, D. A. and Macara, I. G.** (1998). The function of the p190 Rho GTPase-activating protein is controlled by its N-terminal GTP binding domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 34631–8.
- Thomas, D. D., Taft, W. B., Kaspar, K. M. and Groblewski, G. E.** (2001). CRHSP-28 regulates Ca²⁺-stimulated secretion in permeabilized acinar cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 28866–72.
- Thomas, D. D. H., Kaspar, K. M., Taft, W. B., Weng, N., Rodenkirch, L. A. and Groblewski, G. E.** (2002). Identification of annexin VI as a Ca²⁺-sensitive CRHSP-28-binding protein in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 35496–502.
- Thomas, D. D. H., Martin, C. L., Weng, N., Byrne, J. A. and Groblewski, G. E.** (2010). Tumor protein D52 expression and Ca²⁺-dependent phosphorylation modulates lysosomal membrane protein trafficking to the plasma membrane. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C725-39.
- Tiberti, N. and Sanchez, J.-C.** (2015). Comparative analysis of cerebrospinal fluid from the meningo-encephalitic stage of T. b. gambiense and rhodesiense sleeping sickness patients using TMT quantitative proteomics. *Data Br.* **4**, 400–05.
- Tonks, N. K.** (2003). PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett.* **546**, 140–8.
- Tonks, N. K.** (2013). Protein tyrosine phosphatases - from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J.* **280**, 346–78.

- Vaccaro, M. I., Ropolo, A., Grasso, D. and Iovanna, J. L.** (2008). A novel mammalian trans-membrane protein reveals an alternative initiation pathway for autophagy. *Autophagy* **4**, 388–90.
- VanBogelen, R. A. and Olson, E. R.** (1995). Application of two-dimensional protein gels in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* **1**, 69–103.
- Vega, M. A., Seguí-Real, B., García, J. A., Calés, C., Rodríguez, F., Vanderkerckhove, J. and Sandoval, I. V.** (1991). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* **266**, 16818–24.
- Vonlaufen, A., Apte, M., Imhof, B. and Frossard, J.** (2007). The role of inflammatory and parenchymal cells in acute pancreatitis. *J. Pathol.* **213**, 239–48.
- Wang, A. Y.** (2017). Medications and Methods for the Prevention of Post-ERCP Pancreatitis. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* **13**, 188–91.
- Wang, L., Yang, L., Burns, K., Kuan, C.-Y. and Zheng, Y.** (2005). Cdc42GAP regulates c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated apoptosis and cell number during mammalian perinatal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 13484–89.
- Weidberg, H., Shvets, E. and Elazar, Z.** (2011). Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 125–56.
- Whitelegge, J. P.** (2013). Integral membrane proteins and bilayer proteomics. *Anal. Chem.* **85**, 2558–68.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L.** (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143–80.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. and Williams, K. L.** (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 19–50.
- Williams, J. A.** (2001). Intracellular Signaling Mechanisms Activated by Cholecystokinin-Regulating Synthesis and Secretion of Digestive Enzymes in Pancreatic Acinar Cells. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 77–97.
- Williams, J. A.** (2013). Proteomics as a systems approach to pancreatitis. *Pancreas* **42**, 905–11.
- Wilson, S. H., Bailey, A. M., Nourse, C. R., Mattei, M.-G. and Byrne, J. A.** (2001). Identification of MAL2, a Novel Member of the MAL Proteolipid Family, Through Interactions with TPD52-like Proteins in the Yeast Two-Hybrid System. *Genomics* **76**, 81–8.
- Wishart, M. J., Andrews, P. C., Nichols, R., Blevins, G. T., Logsdon, C. D. and Williams, J. A.** (1993). Identification and cloning of GP-3 from rat pancreatic acinar zymogen granules as a glycosylated membrane-associated lipase. *J. Biol. Chem.* **268**, 10303–11.
- Wolters, D. A., Washburn, M. P. and Yates, J. R.** (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **73**, 5683–90.
- Wong, L.-L. and Tsai, H.-H.** (2014). Prevention of post-ERCP pancreatitis. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **5**, 1–10.
- Xu, H. and Ren, D.** (2015). Lysosomal Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 57–80.
- Yan, G.-R. and He, Q.-Y.** (2008). Functional proteomics to identify critical proteins in signal

- transduction pathways. *Amino Acids* **35**, 267–74.
- Yan, J. X., Sanchez, J. C., Rouge, V., Williams, K. L. and Hochstrasser, D. F.** (1999). Modified immobilized pH gradient gel strip equilibration procedure in SWISS-2DPAGE protocols. *Electrophoresis* **20**, 723–6.
- Yönetçi, N., Oruç, N., Özütemiz, Ö., Ak Çelik, H. and Yüce, G.** (2001). Effects of Mast-Cell Stabilization in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Rats. *Int. J. Gastrointest. Cancer* **29**, 163–72.
- You, M. and Zhao, Z.** (1997). Positive effects of SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 on epidermal growth factor- and interferon-gamma-stimulated activation of STAT transcription factors in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 23376–81.
- Yu, J. H., Yun, S. Y., Lim, J. W., Kim, H. and Kim, K. H.** (2003a). Mass spectrometry and tandem mass spectrometry analysis of rat mitochondrial ATP synthase: Up-regulation in pancreatic acinar cells treated with cerulein. *Proteomics* **3**, 2437–45.
- Yu, J. H., Yun, S. Y., Lim, J. W., Kim, H. and Kim, K. H.** (2003b). Proteome analysis of rat pancreatic acinar cells: implication for cerulein-induced acute pancreatitis. *Proteomics* **3**, 2446–53.
- Yu, J. H., Seo, J. Y., Kim, K. H. and Kim, H.** (2008). Differentially expressed proteins in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: implication for acute pancreatitis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 503–16.
- Zahedi, R. P., Sickmann, A., Boehm, A. M., Winkler, C., Zufall, N., Schönfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N. and Meisinger, C.** (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1436–50.
- Zhang, W., Zhao, Y., Zeng, Y., Yu, X., Yao, J., Zhao, S., Bao, Z., Chen, J. and Wang, X.** (2012). Hyperlipidemic Versus Normal-Lipid Acute Necrotic Pancreatitis. *Pancreas* **41**, 317–22.
- Zhao, M., Xue, D.-B., Zheng, B., Zhang, W.-H., Pan, S.-H. and Sun, B.** (2007). Induction of apoptosis by artemisinin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 5612–7.
- Zhou, W., Ross, M. M., Tessitore, A., Ornstein, D., Vanmeter, A., Liotta, L. A. and Petricoin, E. F.** (2009). An initial characterization of the serum phosphoproteome. *J. Proteome Res.* **8**, 5523–31.

Summary

INTRODUCTION

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory condition of the pancreas characterized by a considerable variability in severity. During the course of AP, different pathophysiological responses occur in intrapancreatic regions, including the activation of pancreatic enzymes and inflammatory mediators, the formation of free radicals and changes in blood flow. Some of these factors may also affect peripancreatic tissue or even distant organs. Nevertheless, the molecular mechanisms involved in the development of AP remain incompletely understood, especially the early acinar events, although these signaling mechanisms would determine the development of pancreatitis¹. The use of animal models of AP is important for the understanding of its pathobiology². One of the animal models of the edematous form of AP is that induced by cerulein (Cer). Under the conditions used here the manifestations of pancreatitis include hyperamylasemia, increased pancreatic weight and pancreatic cell size, edema acinar cell damage, and inflammatory cell infiltration³⁻⁵. The intracellular mechanisms by which Cer regulate pancreatic acinar function are very complex and, in this sense, it is reasonable to assume that the development of pancreatitis would be based on rapid early events and the activation of primary signaling pathways, whose unmasking would be important for the study of AP at molecular level¹. Among them, Cer induced AP activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, which requires the phosphorylation of both tyrosine and threonine residues^{6,7}. The adenosine A1-receptor pathway⁸, which decreases intracellular cAMP levels, also becomes activated in AP, and increases in intracellular cAMP are known to enhance secretagogue-sensitive zymogen activation. Also, Cer modulates tyrosine phosphorylation^{9,10}, a central regulatory mechanism of many cell functions that are known to be dissociated in pancreatitis^{11,12}. Recently, our group reported that the expression of three different protein tyrosine phosphatases (PTP) - the SH2-domain containing PTPs SHP-1 and SHP-2, as well as PTP1B - is increased at both the gene and protein levels early on in the development of Cer-induced AP^{13,14}.

Proteomic analysis of tissue extracts from animal models of AP could provide new insights into the pathobiological processes of AP by allowing the identification of the specific proteins that change during its development. As a whole, the elucidation of the complex proteome alterations occurring early on in the development of AP may provide AP-specific biological targets for diagnostic biomarkers, disease prevention, and therapeutic strategies.

Thus, the aim of our study has been to elucidate the proteomics and phosphoproteomics changes involved in the development of AP and, in particular, during the early phase of the disease, in a view to better understand the molecular mechanisms that are linked to several lysosomal proteins alterations, phosphorylation changes (specially, regarding tyrosine phosphorylation) and leukocyte infiltration.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed in male Wistar rats divided into two experimental groups: pancreatic group and control group. Acute pancreatitis was induced in rats by 2 or 4 subcutaneous injections of 20 µg Cer/kg body weight at hourly intervals. The animals were sacrificed at 2, 4, or 9 hours after the first injection, what represents the early, intermediate or final phases of Cer-induced AP, respectively. In some experiments, the type IV phosphodiesterase or the JNK and ERK1/2 cascades were inhibited by rolipram or SP600125 and PD98059, respectively, before the induction of AP. We also studied the influence of different inflammatory cells in the expression of several proteins by using vinblastine sulfate, which elicits a neutropenic state, gadolinium chloride (GdCl₃), which inactivates macrophage activity, and FK506 (tacrolimus) an immunomodulatory drug that preferentially decreases T-lymphocyte proliferation.

The changes in protein and phosphoprotein targets during the early phase of AP were analysed by proteomic TMT and 2-DE techniques of pancreatic fractions. Protein expression and phosphorylation of targets during the early phase of AP and, once the disease has been fully developed, after the blocking/modulation of MAPKs, cAMP as well as after the inhibition of cellular infiltration were mainly evaluated by Western blot or Phos-tag Western blot; in some cases, immunocytochemistry and mRNA quantified by RT-PCR were also performed.

Additionally, human plasma from patients with post-ERCP AP were analysed by immunoblot assays in a view to evaluate the potential use of some of the changes in protein and phosphoprotein targets as clinical biomarkers.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Proteomic analysis of the soluble and the lysosomal+mitochondrial fractions from rat pancreas: Implications for cerulein-induced acute pancreatitis

The present study aims to determine the differentially expressed acidic proteins in the pancreatic soluble and lysosomal+mitochondrial (L+M) fractions from rats during the early phase of the experimental model of Cer-induced AP. Subcellular pancreatic extracts from diseased and control rats were analyzed by 2-DE (3–5.6 pH range) and MALDI-TOF/TOF MS. Comparative analysis afforded the conclusive identification of 13 (soluble fraction.) and 7 (L+M fraction) proteins or protein fragments occurring in different amounts between diseased and control pancreas, some of them being newly described in AP (figure 1).

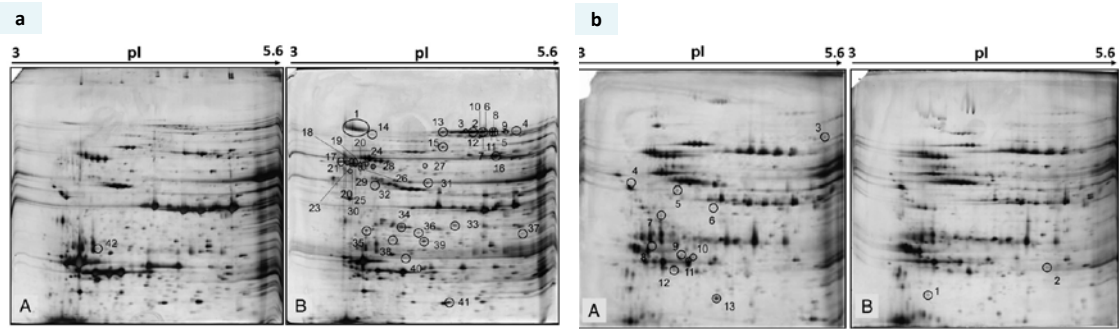


Figure 1. 2-DE maps of pancreatic soluble (a) or L+M (b) fractions derived from control (A) and pancreatic (B, early phase, 2 h after the first injection of Cer) rats. The 42 spots numbered in (a) are those that were differentially expressed [the expression level was more than a three-fold difference higher (1 to 41) or lower (42)] between control and Cer-treated rats. The 13 spots numbered in (b) were differentially expressed [the expression level was more than a three-fold difference higher (1 and 2) or lower (3 to 13)] between control and Cer-treated rats.

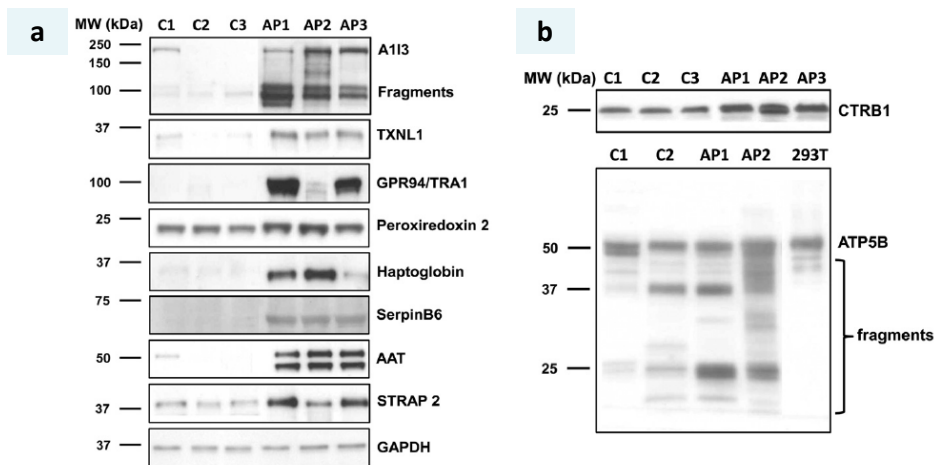


Figure 2. Western blot analysis for the differentially expressed proteins from the soluble (a) or the L+M (b) fraction of the pancreas, identified by LC-MS/MS. In (a), 3 control (C) and 3 pancreatic (AP) animals are shown. In (b), equal loading of the proteins was assessed by Ponceau S staining of the membranes. 3 (CTRB1) or 2 (ATP5B) control (C) and 3 (CTRB1) or 2 (ATP5B) pancreatic (AP) animals are shown. 293 T cell lane in the lower panel was included as internal control for the assessment of the correct molecular weight of ATP5B.

In the soluble fraction, we detected changes related to inflammation and apoptosis (α 1-inhibitor-3, α -1 antitrypsin, α -1 macroglobulin, haptoglobin, STRAP), oxidative stress and stress response (peroxiredoxin-2, thioredoxin-like 1, GRP94/TRA1, heat shock cognate 71 kDa protein), digestive proteases (elastase 3B), serine protease inhibition (serpins B6 and A3L) and translation processes (EF 1- δ). In the L+M fraction, we detected changes mainly related to energy generation or cellular metabolism (ATP synthase β subunit, chymotrypsinogen B,

triacylglycerol lipase), cell redox homeostasis (iodothyronine 5' monodeiodinase) and digestive proteases (carboxypeptidase B1). (Figure 2) The data should provide valuable information for unraveling the early pathophysiologic mechanisms of Cer-induced AP.

2. Changes in the expression of LIMP-2 during cerulein-induced pancreatitis in rats: Effect of inhibition of leukocyte infiltration, cAMP and MAPKs early on in its development

Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2) is an important protein in lysosomal biogenesis and function and also plays a role in the tissue inflammatory response. It is known that lysosomes play a central role in AP, with inflammatory cell infiltration triggering the disease early on. In this study, we report increases in pancreatic LIMP-2 protein and mRNA levels as early events that occur during the development of Cer-induced AP in rats (figure 3).

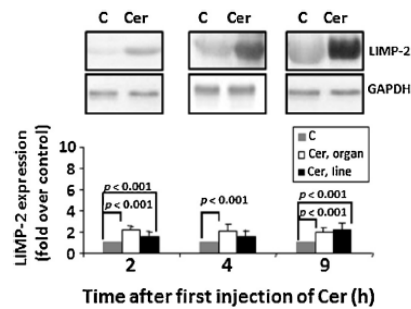


Figure 3. Expression of LIMP-2 protein during the development of Cer-induced AP. Data are means \pm S.D. of 6 animals.

GdCl₃, a macrophage inhibitor, but not FK506, a T lymphocyte inhibitor, was able to reverse the increase in LIMP-2 expression after Cer treatment, although such reversion was abolished if the animals were depleted of neutrophils due to a vinblastine sulfate pre-treatment (figure 4a). Immunostaining revealed that the cellular source of LIMP-2 was mainly acinar cells.

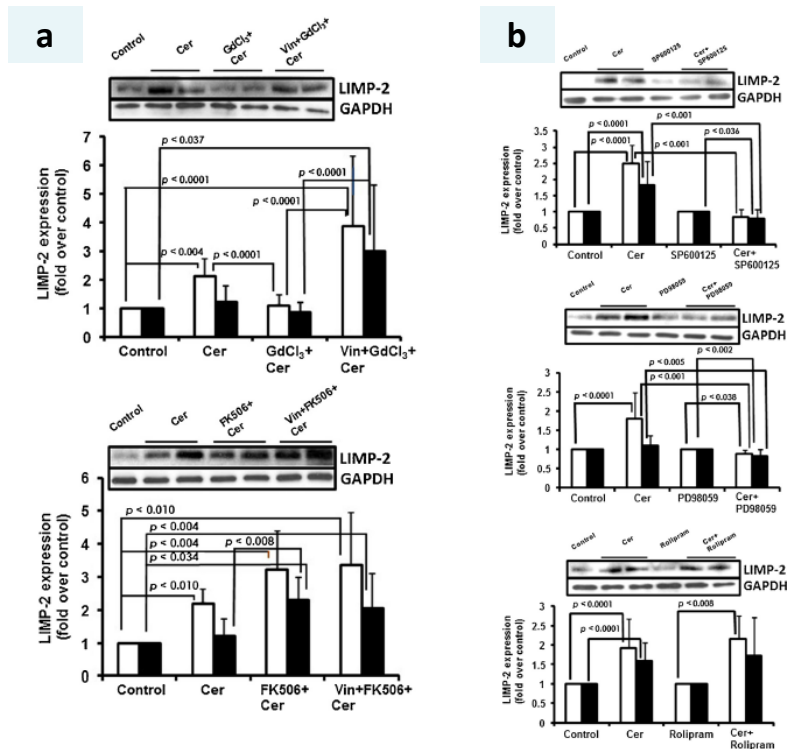


Figure. 4. a) Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on LIMP-2 protein expression in the intermediate phase of Cer-induced AP b) Effect of MAPKs and PDE4 inhibitor pretreatments on LIMP-2 protein expression in the early phase of Cer-induced AP .Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

Additionally, pre-treatments with the MAPKs inhibitors SP600125 and PD98059, inhibitors of JNK and ERK $\frac{1}{2}$ activation, respectively, but not of rolipram, a type IV phosphodiesterase inhibitor, suppressed the increase in the expression of LIMP-2 after Cer administration (figure 4b).

Together, these results indicate that neutrophils are able to drive a macrophage activation that would regulate the increase in LIMP-2 expression during the early phase of Cer-induced AP, with the stress kinases JNK and ERK $\frac{1}{2}$ also playing a coordinated role in the increase of LIMP-2 expression due to Cer.

3. A Tandem Mass Tag (TMT) proteomic analysis during the early phase of experimental pancreatitis reveals new insights in the disease pathogenesis

We performed in a rat pancreatic model a high-throughput shotgun proteomic profiling of the soluble and whole membrane fractions from the pancreas during the early phase of Cer-induced AP compared to controls. We identified 997 proteins, of which 353 were differentially

expressed significantly (256, 55, or 22 in the soluble, the membrane or in both fractions, respectively). We then verified the proteomic data by immunoblotting of 11 and 7 different soluble or membrane-associated proteins, either novel or known players in AP (figure 5).

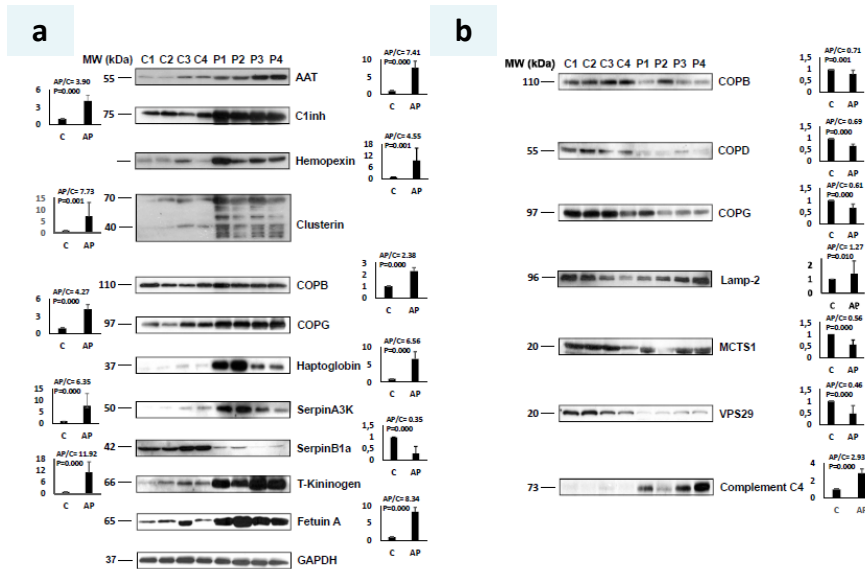


Figure 5. Immunoblot verification of selected proteins from the soluble (a) or the whole membrane (b) fraction of the pancreas that change their expression levels during the early phase of Cer-induced AP.

Gene ontology and KEGG PATHWAY analyses revealed that these proteins were implicated in molecular mechanisms relevant to AP pathogenesis, including vesicle-mediated and protein transport, lysosomal and mitochondrial impairment or proteolysis. Moreover, numerous metabolic processes were downregulated apparently to reduce energy consumption, and a remarkable increase in inflammatory and stress responses were also highlighted (figure 6). As a whole, our data provide valuable information for unraveling early pathophysiological mechanisms of Cer-induced AP.

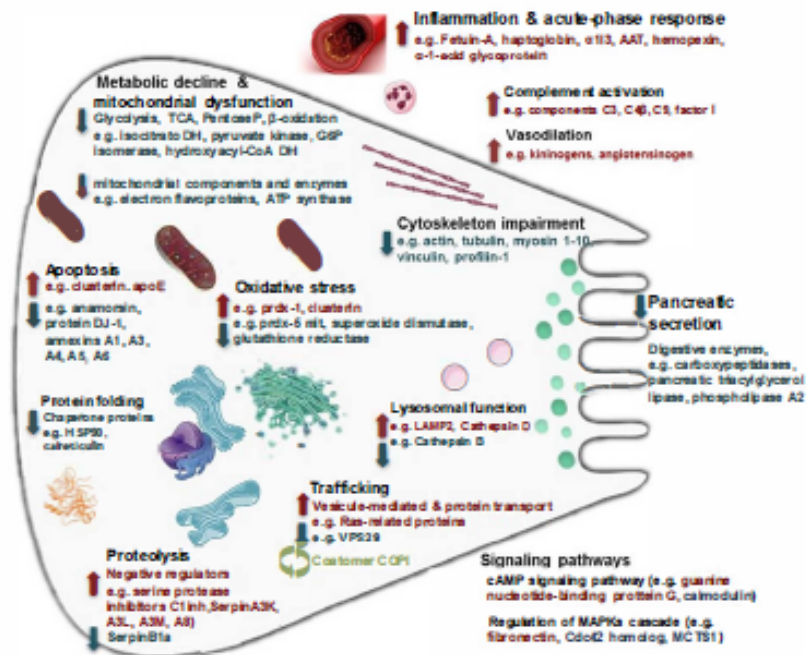


Figure 6. Pathogenic mechanisms potentially involved in the onset of Cer-induced AP according to our bioinformatics analysis.

4. Modulation in the expression of SHP-1, SHP-2 and PTP1B due to the inhibition of MAPKs, cAMP and neutrophils early on in the development of cerulein-induced acute pancreatitis in rats

The protein tyrosine phosphatases (PTPs) SHP-1, SHP-2 and PTP1B are overexpressed early on during the development of Cer-induced AP in rats, and their levels can be modulated by some species of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), the intracellular levels of cAMP and by general leukocyte infiltration, the latter at least for SHP-2 and PTP1B. In this study we show that Cer treatment activates ERK and JNK but not p38 MAPK during the early phase of Cer-induced AP (2 h after the first injection of Cer). Therefore, by using the MAPK inhibitors SP600125 (a specific JNK inhibitor) and PD98059 (a specific ERK inhibitor), we have unmasked the particular MAPK that underlies the modulation of the expression levels of these PTPs (figure 7). JNK would act by preventing SHP-1 protein expression from increasing beyond a certain level. ERK 1/2 was the main MAPK involved in the increase in SHP-2 protein expression due to Cer. JNK negatively modulated the SH2-domain containing PTPs. Both MAPKs played a role in the increase in PTP1B protein expression due to Cer.

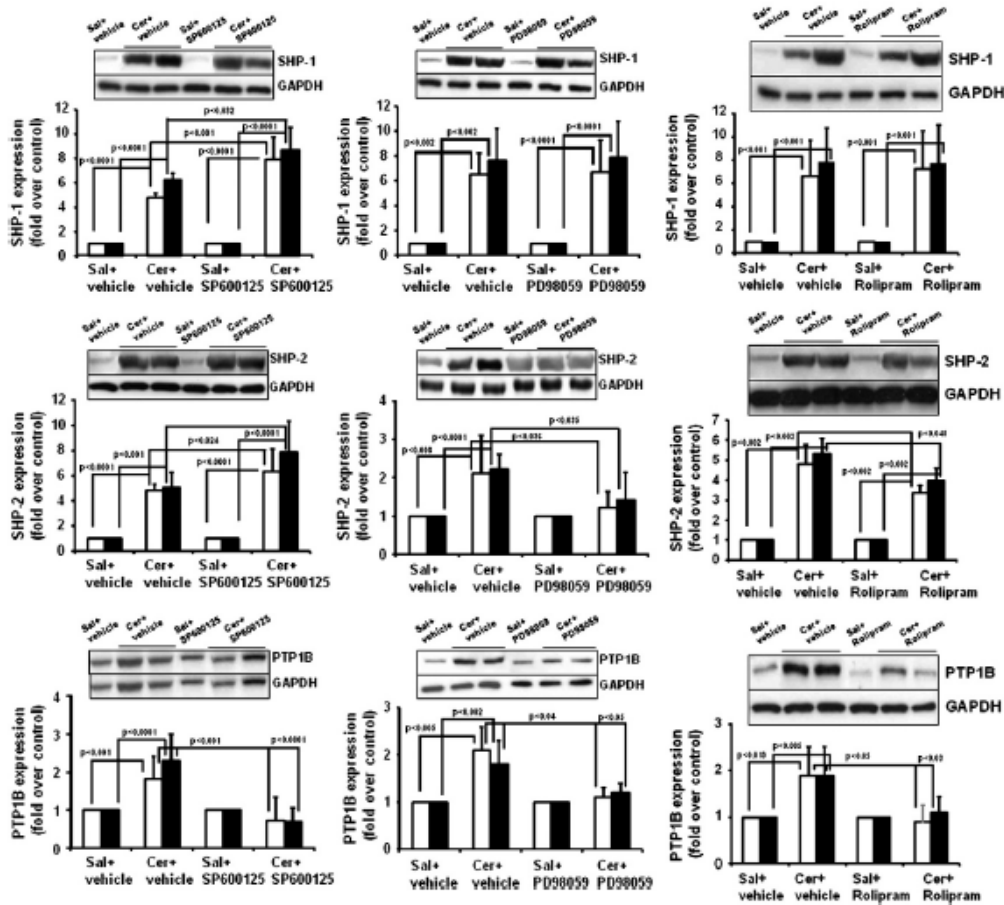


Figure 7. Effect of MAPK and PDE4 inhibitor pretreatments on SHP-1, SHP-2 and PTP1B protein expression in the early phase of Cer-induced AP. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

Finally, by using the white blood cell inhibitors vinblastine sulfate, gadolinium chloride and FK506 (tacrolimus), we show that the macrophage activity or T-lymphocytes does not modulate the expression of any of the PTPs, although neutrophil infiltration was found to be a regulator of SHP-2 and PTP1B protein expression due to Cer (figure 8).

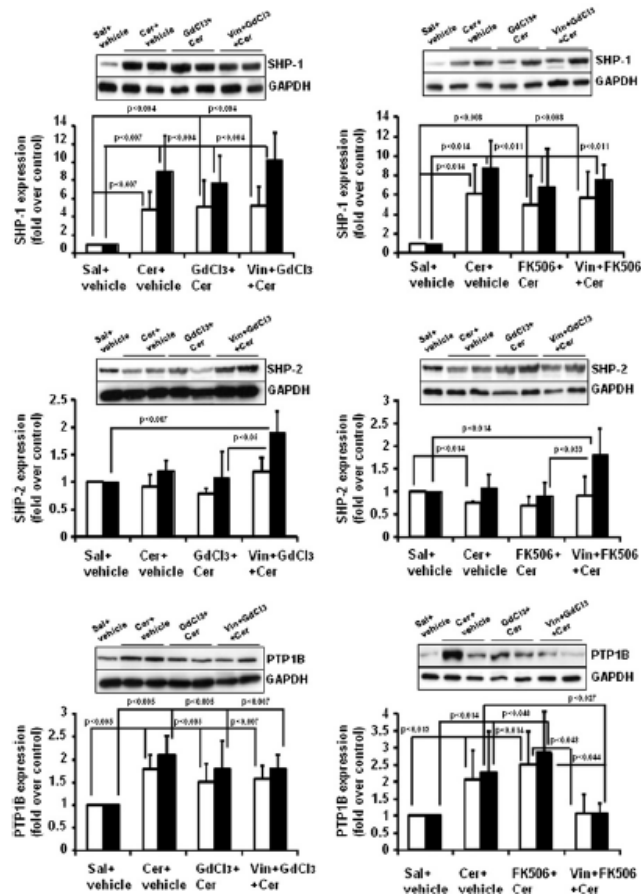


Figure 8. Effect of white blood cell inhibitor pretreatments on SHP-1, SHP-2 and PTP1B protein expression in the intermediate phase of Cer-induced AP. Data are means \pm S.D. of 3 experiments with 3 rats per group in each experiment.

5. Phosphoproteomics of the early phase of experimental pancreatitis

Identification of phosphoproteins associated with the onset of AP may provide useful information on the mechanisms of the disease and insights into the development of diagnostic and therapeutic procedures. In the current study, we performed a phosphoproteomic analysis during the early phase of Cer-induced AP on pancreatic subcellular extracts by the combination of two alternative approaches: (i) sequential 2-DE gel staining with a fluorescence phosphosensor dye, Pro-Q Diamond dye, followed by SYPRO Ruby staining to reveal total protein expression; (ii) quantitative TMT⁶plex phosphoproteomics combined to TiO₂ phosphopeptide enrichment.

2-DE-based phosphoproteomics detected 10 soluble proteins whose phosphorylation levels were modulated during the onset of Cer-induced AP (figure 9). These

proteins were mainly related to transcriptional processes as well as endomembrane system mechanisms.

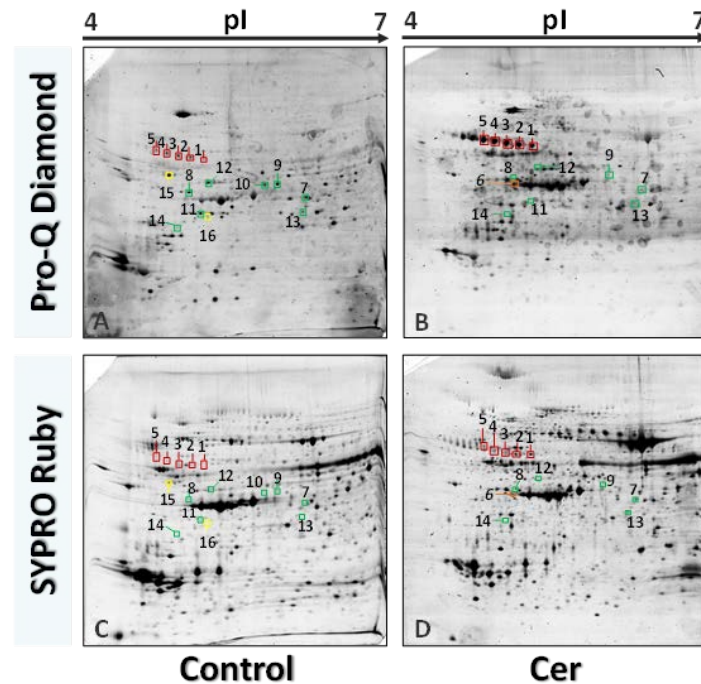


Figure 9. Phosphoproteomic analysis of pancreatic soluble fractions derived from control (C) and pancreatic (Cer, early phase) rats. In red, the 5 spots whose phosphorylation levels were higher in pancreatic rats. In orange, the spot that became phosphorylated in PA. In green, the 8 spots whose phosphorylation levels were higher in control rats. In yellow, the 2 spots that became dephosphorylated in PA.

Quantitative shotgun phosphoproteomic analysis revealed that the phosphorylation levels of 12 phosphosites in 10 phosphoproteins (soluble fraction) and 7 phosphosites in 5 phosphoproteins (membrane fraction) were markedly up-regulated, while 5 and 9 phosphosites in 5 and 8 phosphoproteins were significantly down-regulated in the soluble and whole membrane fractions respectively, after the Cer treatment ($q < 0.05$). These modulated phosphoproteins were associated to trafficking and exocytosis, and related to the endolysosomal system.

One single protein, fetuin A, was identified as differentially phosphorylated by both strategies, whose changes in phosphorylation levels (figure 10), as well as those of StARD10, ARHGAP1 or TPD54 were further verified by Phos-tag SDS-PAGE immunoblots.

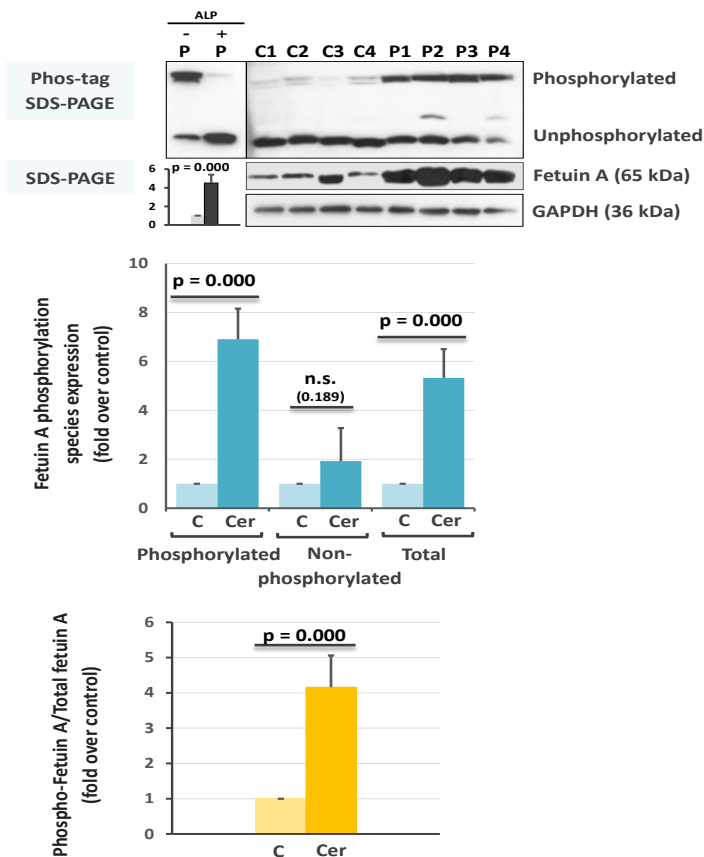


Figure 10. Phos-tag SDS-PAGE and immunoblot verification of fetuin A phosphorylation changes during the early phase of Cer-induced AP. Data are means \pm S.D. of 4 experiments with 2 rats per group in each experiment. C: control. P: pancreatic

6. Fetuin A as a potential biomarker of post-ERCP AP.

Finally, we also analysed the protein expression and phosphorylation levels of fetuin A in human plasma from patients with post-ERCP AP in a view to evaluate its potential application as a clinical biomarker. Plasma samples from 5 post-ERCP AP patients were obtained 4 hours before (-4h), 4 hours after (+4h) or 24 hours after (+24h) the ERCP procedure. Plasmas were enriched in medium and low-abundance proteins by ProteoMiner™ and subjected to immunoblot tests. Patients not developing post-ERCP AP served as control (n=5).

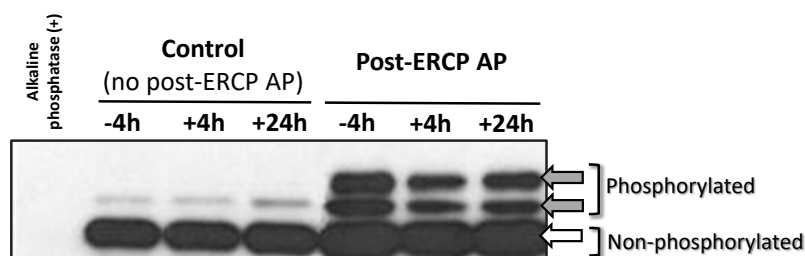


Figure 11. Changes in the phosphorylation pattern of fetuin A 4 hours before (-4h), 4 (+4h) and 24 (+24h) hours after ERCP in plasma from patients developing ERCP-induced AP.

As shown in figure 11, a differential phosphorylation pattern was observed in patients

developing post-ERCP AP as compared to the control group, with the presence of an additional phosphorylated isoform. Preliminary results on total expression levels were non-conclusive (data not shown).

CONCLUSIONS

1. The characterization of protein expression profiles by 2-DE in two subcellular fractions of the pancreas, led to the identification of changes in the expression of proteins related to inflammation and apoptosis, oxidative stress and responses to stress, energy generation, cell metabolism and transcription processes, and redox homeostasis, as well as in digestive proteases and serine protease inhibitors.
2. The increase in pancreatic acinar cell LIMP-2, is an early event that occur during the development of acute pancreatitis induced by cerulein, with infiltrating cells playing a central role. Specifically, macrophages, upon activation by neutrophils, regulate the expression of LIMP-2.
3. The stress kinases JNK and ERK1/2 play a coordinated role in the increase of LIMP-2 expression due to cerulein.
4. TMT proteomic analyses, complemented with bioinformatic techniques, allowed us to ascribe the differentially expressed soluble and membrane associated proteins, to various molecular mechanisms such as vesicular protein transport, lysosomal and mitochondrial alterations and proteolysis. In addition, numerous metabolic processes are regulated negatively, and on the opposite, stress and inflammatory responses become highly developed.
5. During the early phase of acute pancreatitis induced by cerulein there is some kind of redistribution of the COPB and COPG coatomers from the membranes to the soluble fraction, a feature that must affect protein traffic.
6. PTP species SHP-1, SHP-2 and PTP1B are overexpressed, in a way that is modulated by MAPKs, during the early development of cerulein induced acute pancreatitis. JNK acts by preventing SHP-1 protein expression from increasing beyond a certain level, and negatively modulate the SH2-domain containing PTPs. ERK1/2 is the main MAPK involved in the increase in SHP-2 protein expression, and both JNK and ERK1/2 play a role in the increase in PTP1B protein expression due to cerulein.

7. High levels of intracellular cAMP significantly suppress the increase of SHP-2 and PTP1B protein expression due to cerulein.
8. Neutrophil infiltration regulates the increase of SHP-2 and PTP1B protein expression due to cerulein.
9. Phosphoproteomic analyses of soluble and membrane-associated proteins of the pancreas by 2-DE and TMT proteomic analysis, led us to establish that differential phosphorylation mainly affects proteins related to the modulation of the endolysosomal system and the endoplasmic reticulum, to protein and membrane traffic, or to exocytosis, as well as to protein translation.
10. Fetuin A was the only differentially regulated phosphoprotein that is detected by the two proteomic methods, and its expression increase is almost entirely due to the phosphorylated form.
11. The dramatic decrease in StARD10 phosphorylation levels indicates that StARD10-mediated lipid exchange among cell membranes is promoted during the early phase of cerulein induced acute pancreatitis.
12. The decrease in the phosphorylation level of TPD52 and TPD54 suggests a decrease in early endolysosomal traffic that participates in the blockage of the classical secretory pathway of pancreatic acinar cells.
13. Changes in the phosphorylation level of fetuin A detected in human plasma makes this protein a promising candidate for clinical use of at least ERCP-induced pancreatitis

REFERENCES

1. Ji B, Chen X, Misk DE, et al. Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. *Physiol Genomics*. 2003;14(1):59-72. doi:10.1152/physiolgenomics.00174.2002.
2. Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas*. 2007;34(1):1-14. doi:10.1097/01.mpa.0000246658.38375.04.
3. Alonso R, Montero A, Arévalo M, et al. Platelet-activating factor mediates pancreatic function derangement in cerulein-induced pancreatitis in rats. *Clin Sci (Lond)*. 1994;87(1):85-90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520381>. Accessed July 12, 2017.
4. Pescador R, Manso MA, Rebollo AJ, de Dios I. Effect of chronic administration of hydrocortisone on the induction and evolution of acute pancreatitis induced by cerulein. *Pancreas*. 1995;11(2):165-172. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479674>. Accessed July 12, 2017.
5. Yönetçi N, Oruç N, Özütmez Ö, Ak Çelik H, Yüce G. Effects of Mast-Cell Stabilization in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Rats. *Int J Gastrointest Cancer*. 2001;29(3):163-172. doi:10.1385/IJGC:29:3:163.
6. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*. 1999;79(1):143-180.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922370>. Accessed July 12, 2017.
7. Minutoli L, Altavilla D, Marini H, et al. Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis. *Life Sci.* 2004;75(24):2853-2866. doi:10.1016/j.lfs.2004.03.040.
 8. Satoh A, Shimosegawa T, Satoh K, et al. Activation of adenosine A1-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats. *Gastroenterology.* 2000;119(3):829-836. doi:10.1053/gast.2000.16502.
 9. Rivard N, Rydzewska G, Lods JS, Martinez J, Morisset J. Pancreas growth, tyrosine kinase, PtdIns 3-kinase, and PLD involve high-affinity CCK-receptor occupation. *Am J Physiol.* 1994;266(1 Pt 1):G62-70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304459>. Accessed July 12, 2017.
 10. Rivard N, Rydzewska G, Lods JS, Morisset J. Novel model of integration of signaling pathways in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol.* 1995;269(3 Pt 1):G352-62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573445>. Accessed July 12, 2017.
 11. Schnekenburger J, Mayerle J, Krüger B, et al. Protein tyrosine phosphatase kappa and SHP-1 are involved in the regulation of cell-cell contacts at adherens junctions in the exocrine pancreas. *Gut.* 2005;54(10):1445-1455. doi:10.1136/gut.2004.063164.
 12. Lerch MM, Lutz MP, Weidenbach H, et al. Dissociation and reassembly of adherens junctions during experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 1997;113(4):1355-1366. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322531>. Accessed July 12, 2017.
 13. Sarmiento N, Sánchez-Bernal C, Ayra M, et al. Changes in the expression and dynamics of SHP-1 and SHP-2 during cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(4):271-279. doi:10.1016/j.bbadis.2008.01.005.
 14. Sarmiento N, Sánchez-Bernal C, Pérez N, et al. Rolipram and SP600125 Suppress the Early Increase in PTP1B Expression During Cerulein-Induced Pancreatitis in Rats. *Pancreas.* 2010;39(5):639-645.

