



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“La activación del receptor para hidrocarburos arilo (Ahr) modula
la expresión de citocinas inflamatorias a través de la promoción
de la degradación de NF- κ B (RelA/p65) en macrófagos
peritoneales de ratón”**

Tesis que presenta:

M. en C. Omar Domínguez Acosta

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Director de la tesis: Dr. Guillermo Elizondo Azuela

Ciudad de México

Octubre, 2018

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección del Dr. Guillermo Elizondo Azuela.

Comité tutorial:

Director de tesis: Dr. Guillermo Elizondo Azuela.

Departamento de Biología Celular

CINVESTAV-IPN

Asesores:

Dr. Leopoldo Flores Romo

Departamento de Biología Celular

CINVESTAV-IPN

Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Departamento de Biología Celular

CINVESTAV-IPN

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

UBIMED, FES-IZTACALA, UNAM

Durante la realización de este trabajo, el estudiante recibió la beca 420660 otorgada por el CONACyT para realizar sus estudios de doctorado. Este proyecto se llevó a cabo mediante el apoyo de CONACyT a través del proyecto No. 153377.

DEDICATORIAS

Éste trabajo de tesis y todo lo que involucró su realización está dedicado en primer término a mi fe en Dios.

A mi más grande apoyo, mi madre Silvia que con sus consejos y apoyo inculcó en mi los valores y la determinación de luchar por todos mis sueños, a mi Padre Juan Ángel que con su arduo trabajo día a día ha representado en mi un ejemplo de esfuerzo, a mi hermano Juan Enrique por mostrarme apoyo en tantos años, gracias.

A mi familia: Rocío, Alberto, Guillermo, Jessica, Mónica, Anna, Guadalupe, Dnieper y todos los que siempre me han apoyado y motivado por alcanzar la totalidad de mis metas.

A mis buenos amigos Jennifer, Fernando, Nicté, Alegre, Javier, Odette, Jacobo, Mariana, Isis, José, Emmanuel, Alejandro, Carmen, Susana, Laura, Aidé y todos aquellos con quienes compartí muchos momentos académicos y personales que los volvieron parte importante de todo lo vivido.

También dedico esta tesis a Cleo Marcial por haberme apoyado en la culminación de ésta etapa y caminar conmigo en el presente y hacia el futuro, siempre hacia lo mejor.

Y a todo aquel que se dedicó a poner en mí una sonrisa en todo momento, alentarme o hacerme seguir adelante, IDEM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Guillermo Elizondo Azuela por la asesoría y apoyo, así como la atención depositada en mi persona para la realización de éste proyecto.

Agradezco la asesoría de la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, el Dr. José Leopoldo Flores Romo, el Dr. Vianney Ortiz Navarrete y del Dr. José Eduardo Pérez Salazar por su contribución y atención.

Agradezco a la Dra. María Asunción Cabañas Cortés por su apoyo y colaboración en el desarrollo de éste proyecto, especialmente en el manejo y cuidado de los modelos murinos así como su asesoría en métodos experimentales.

Agradezco al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) por abrirme las puertas de la institución y brindarme un entorno de crecimiento profesional y humano.

Agradezco al Departamento de Biología Celular del CINVESTAV y a los profesores investigadores que contribuyeron en mi formación y alimentaron en mí el deseo de desarrollarme y ser parte de la investigación científica en México.

Agradezco al CONACyT por otorgarme los recursos para la realización de éste proyecto a través de la beca 420660.

ÍNDICE GENERAL	Página
LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1. El receptor para hidrocarburos arilo.....	18
1.2. El Sistema Inmune.....	23
1.2.1. Los macrófagos.....	25
1.2.2. El factor nuclear Kappa B.....	28
1.3. El Sistema Inmune y el Ahr.....	31
1.3.1. Ahr en el Sistema Inmune adaptativo.....	32
1.3.2. Ahr en el Sistema Inmune innato.....	34
2. JUSTIFICACIÓN.....	37
3. HIPÓTESIS.....	38
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo general.....	38

4.2. Objetivos particulares.....	38
5. MÉTODOS.....	40
5.1. Diseño experimental.....	40
5.2. Animales.....	46
5.3. Cultivo de macrófagos peritoneales.....	46
5.4. Tratamientos de los cultivos celulares.....	47
5.5. Determinación de los niveles proteínicos de las citocinas.....	47
5.6. Western blot.....	49
5.7. Microscopía confocal.....	51
5.8. Obtención de TUBEs.....	52
5.9. Ensayos de ubiquitinación.....	53
5.10. Extracción de ARN total.....	54
5.11. Síntesis de cDNA.....	56
5.12. Determinación de niveles de ARNm por PCR cuantitativo (qPCR).....	56
5.13. Análisis estadístico.....	58
6. RESULTADOS.....	59

6.1. Evaluación del efecto de la activación del Ahr sobre los niveles proteicos de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-12 en macrófagos peritoneales de ratón.....	59
6.2. La activación del Ahr promueve la degradación proteosomal de RelA/p65.....	62
6.3. La activación del Ahr promueve la ubiquitinación de RelA/p65.....	65
6.4. La activación del Ahr disminuye los niveles de P-RelA/p65.....	68
6.5. El TCDD induce la formación de estructuras similares a vacuolas en macrófagos peritoneales.....	71
6.6. La activación del Ahr induce la expresión de COMMD1.....	73
7. DISCUSIÓN.....	78
8. CONCLUSIONES.....	86
9. PERSPECTIVAS.....	87
10. REFERENCIAS.....	88
11. APENDICE I.....	96

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tipos de macrófagos.....	26
Tabla 2. Citocinas reguladas por NF-κB.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura proteica del receptor para hidrocarburos arilo de ratón.....	19
Figura 2. Modelo de la vía de señalización del Ahr.....	20
Figura 3. Ligandos del Ahr.....	22
Figura 4. Células del Sistema Inmune.....	24
Figura 5. Vías de activación alternativa y clásica de NF-κB...	30
Figura 6. El TCDD y la βNF disminuyen los niveles proteicos del TNF-α, IL-6 e IL-12 en macrófagos peritoneales de ratón..	60
Figura 7. El TCDD y la βNF no modifican los niveles proteicos de TNF-α, IL-6 e IL-12 en macrófagos peritoneales de ratones <i>Ahr</i> -nulos.....	61
Figura 8. El Ahr promueve la degradación proteosomal de RelA/p65.....	64
Figura 9. La activación del Ahr promueve la ubiquitinación de RelA/p65.....	65
Figura 10. La ubiquitinación de RelA/p65 es dependiente del Ahr.....	66
Figura 11. La ubiquitinación de RelA/p65 es dependiente de la actividad Transcripcional.....	67
Figura 12. La activación del Ahr disminuye los niveles proteicos de P-RelA/p65.....	69

Figura 13. La disminución de los niveles proteicos de P-RelA/p65 provocada por el TCDD es dependiente del Ahr.....	70
Figura 14. El TCDD induce la formación de estructuras similares a vacuolas en macrófagos peritoneales.....	72
Figura 15. Análisis de la región promotora del gen <i>socs1</i>.....	74
Figura 16. Análisis de la región promotora del gen <i>commd1</i>..	75
Figura 17. La activación del Ahr induce la expresión de <i>commd1</i>.....	77
Figura 18. El Ahr induce la degradación proteínica de RelA/p65 a través del SUP y la vía lisosomal	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
Ahr	Receptor para hidrocarburos arilo
AKR3A1	3-hidroxiesteroide deshidrogenasa-1
bHLH	Básico hélice-bucle-hélice
BSA	Albúmina de suero bovino
cm	Centímetros
COMMD1	Proteína del dominio MURR1 del metabolismo del cobre-1
Cyp1a1	Citocromo P4501a1
Cyp1a2	Citocromo P4501a2
Cyp1b1	Citocromo P4501b1
Cyp2s1	Citocromo P4502s1
DEPC	Dietileno policarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
GST	Glutación-S-transferasa
h	Horas
HAHs	Hidrocarburos aromáticos halogenados
HSP90	Proteína de choque térmico 90
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12

IL-8	Interleucina 8
kDa	Kilo daltones
LPS	Lipopolisacárido
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
NES	Señal de exportación nuclear
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanómetros
NQO1	NAD(P)H Quinona oxidoreductasa 1
°C	Grados centígrados
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PBS	Amortiguador fosfato salino
pg	Picogramos
qPCR	PCR cuantitativo
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos

SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio
SOCS1	Supresor de señalización de citocinas 1
TA	Temperatura ambiente
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-<i>p</i>-dioxina
TLR	Receptor tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UGT1A6	UDP-glucuronosiltransferasa
V	Voltios
XRE	Elementos de respuesta a xenobióticos
βNF	Beta-naftoflavona
μg	Microgramos
μM	Micromolar

RESUMEN

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción que tiene un papel importante en diversos procesos celulares, incluidos la proliferación celular, apoptosis, desarrollo neuronal y embrionario y de manera importante en la respuesta inmune a través de generar un proceso inflamatorio. En el presente estudio se demuestra que el receptor para hidrocarburos arilo (Ahr) regula de manera negativa la respuesta inflamatoria mediada por el lipopolisacárido (LPS) e interferón gama (IFN γ) en macrófagos peritoneales de ratón. Los resultados indican que la activación del Ahr por sus agonistas el 2,3,7,8 tetracloro dibenzo-*p*-dioxina (TCDD) y la β -naftoflavona (β NF) resulta en una disminución en los niveles proteínicos de las citocinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 12 (IL-12). En contraste, dicho efecto no se observó en macrófagos peritoneales de ratones *Ahr*-nulos. Por otro lado, el tratamiento con TCDD también provoca un aumento en la ubiquitinación y degradación proteosomal de RelA/p65 de manera dependiente del Ahr. Además, se requiere de la actividad transcripcional para que se dé dicho proceso degradativo. Adicionalmente, el TCDD indujo en los macrófagos la formación de estructuras membranales similares a vacuolas, sugiriendo que la degradación de RelA/p65 también ocurre por la vía lisosomal, probablemente a través de autofagia. Finalmente, se observó que la activación del Ahr es capaz de inducir los niveles de ARNm y de proteína de commd1, componente del complejo ubiquitinador cuyo blanco es RelA/p65. En resumen, el presente trabajo muestra que el Ahr modula la degradación de RelA/p65 en macrófagos peritoneales de ratón por las dos

principales vías de degradación de proteínas en células eucariotas: la vía ubiquitina-proteosoma y la vía lisosomal.

ABSTRACT

The nuclear factor kappa B (NF- κ B) is a transcription factor that has an important role in several cellular processes, including cell proliferation, apoptosis, neuronal and embryonic development and importantly in the immune response through generating an inflammatory process. The present study demonstrate that the aryl hydrocarbon receptor (Ahr) negatively regulates the inflammatory response mediated by lipopolysaccharide (LPS) and interferon gamma IFN γ in mouse peritoneal macrophages. The results indicate that the activation of Ahr by its agonists 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) and β -naftoflavone (β -NF) results in a decrease in the protein levels of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 12 (IL-12). In contrast, this effect was not observed in *Ahr*-null mouse peritoneal macrophages. On the other hand, treatment with TCDD also causes an increase in ubiquitination and proteosomal degradation of RelA/p65 in a Ahr dependent manner. In addition, transcriptional activity is required for this degradative process to occur. Besides, TCDD, in macrophages, induced the formation of membrane structures similar to vacuoles, suggesting that the degradation of RelA/p65 also occurs via the lysosomal pathway, probably through autophagy. Finally, it was observed that Ahr activation is able to induce both mRNA and protein levels of commd1, a component of the ubiquitinating complex whose target is RelA/p65. In summary, the present work shows that Ahr modulates the degradation of RelA/p65 in mouse peritoneal macrophages by the two main pathways of protein degradation in eukaryotic cells: the ubiquitin-proteosome pathway and the lysosomal pathway.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El receptor para hidrocarburos arilo

El receptor para hidrocarburos arilo (Ahr) es un factor de transcripción citosólico activado por ligando que regula la expresión de genes que codifican para enzimas metabolizadoras de xenobióticos, tanto de fase I (cyp1a1, cyp1a2, cyp1b1, cyp2s1) como de fase II (ugt1a6, nqo1, akr3a1 y diversas gst) [1, 2]. Pertenece a una familia de reguladores transcripcionales que poseen dos motivos estructurales característicos, el dominio básico hélice-bucle-hélice o bHLH (por sus siglas en inglés) y el dominio PAS llamado así debido a que las tres primeras proteínas identificadas con este motivo fueron Per, ARNT y Sim. El dominio bHLH se encuentra localizado en la región N-terminal y está constituido por dos hélices alfa separadas por un rizo. Esta región contiene el dominio de unión al DNA. El dominio PAS se encuentra localizado en la región C-terminal del dominio bHLH. Este está constituido de 260-310 aminoácidos e incorpora dos repetidos hidrofóbicos bien conservados, llamados PAS-A y PAS-B, separados por una región espaciadora poco conservada. El dominio PAS-A sirve como sitio de anclaje para otras proteínas PAS y es la región a la que la proteína chaperona HSP90 se une. El dominio PAS-B posee el sitio de unión al ligando que parcialmente se traslapa con el sitio de unión a HSP90 (Figura 1).

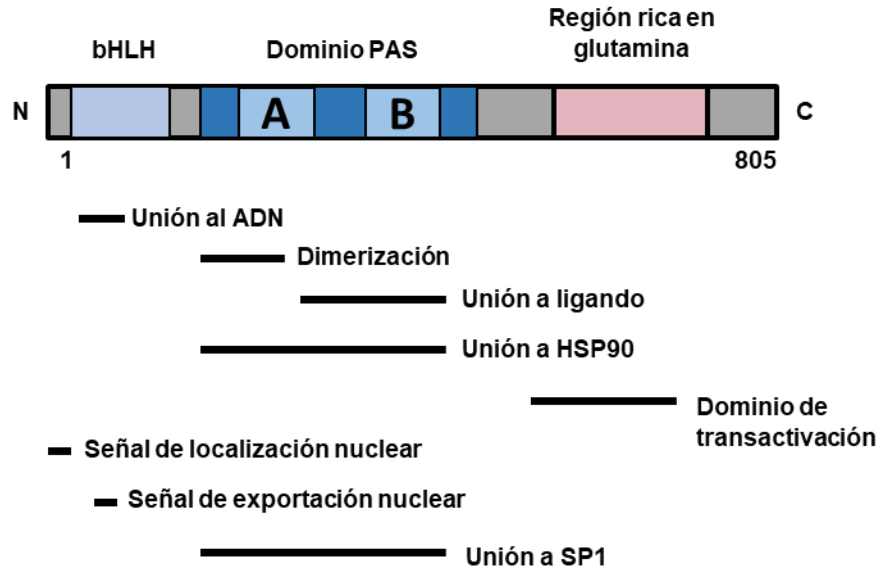


Figura 1. Estructura proteica del receptor para hidrocarburos arilo de ratón (Modificado de [3]).

El Ahr está normalmente presente en el citoplasma formando un complejo con la proteína Hsp90, la proteína X asociada al virus de la hepatitis B (XAP2) y la proteína chaperonina p23 [4, 5]. Al ser activado por un ligando, el receptor sufre cambios conformacionales que exponen una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) lo que le permite translocarse hacia el núcleo en donde se disocia de sus proteínas chaperonas y se asocia al translocador nuclear del Ahr (Arnt, por sus siglas en inglés). El heterodímero Ahr-Arnt se une entonces a los elementos de respuesta para dioxinas también llamados elementos de respuesta para xenobióticos (DREs o XREs, por sus siglas en inglés) los cuales están constituidos por la secuencia nucleotídica 5`-GCGTC-3`. Estos elementos se localizan en los promotores de sus genes blanco como lo son aquellos que codifican

para enzimas metabolizadoras de xenobióticos de fase I (cyp1a1, cyp1a2 y cyp1b1, ugt1a1) y fase II (gst y nqo1) (Figura 2).

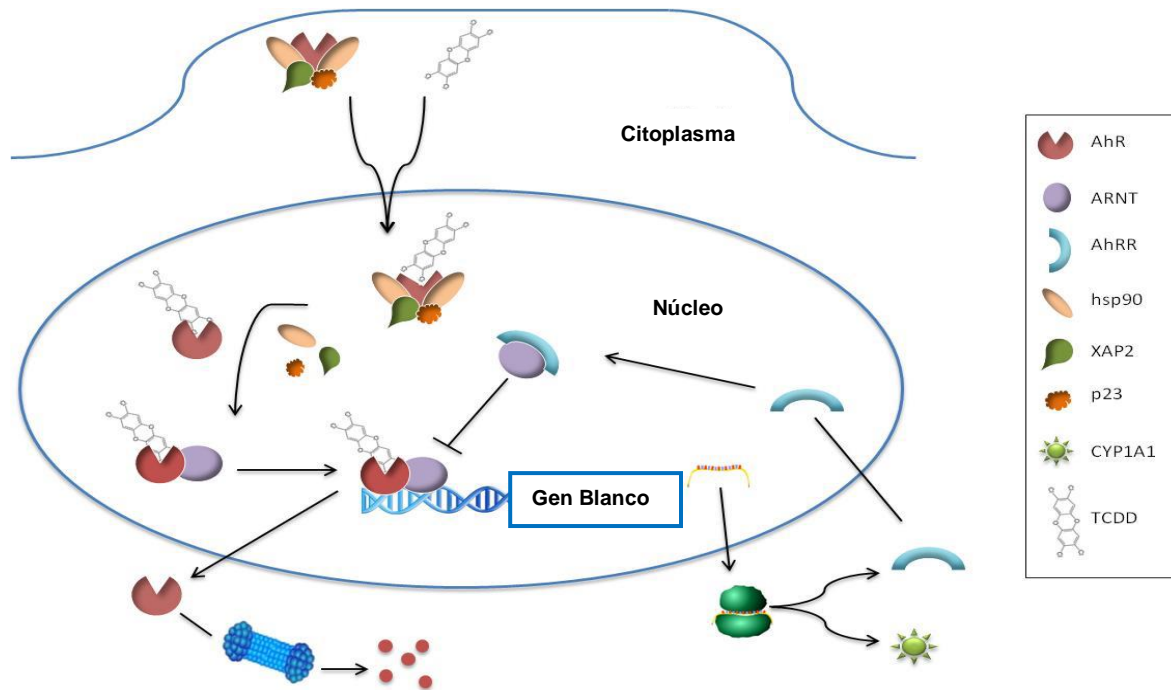


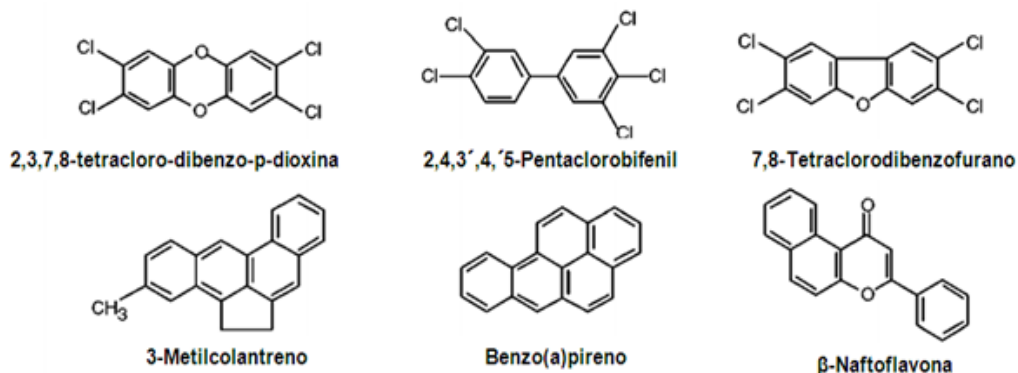
Figura 2. Modelo de la vía de señalización del Ahr. Una vez que el Ahr se une a su ligando (TCDD), la señal de translocación nuclear es expuesta y el receptor es translocado al núcleo donde se disocia del complejo de proteínas chaperonas XAP2, hsp90 y p23. Posteriormente, dimeriza con Arnt y se une a sus XREs regulando la expresión de sus genes blanco. El receptor subsecuentemente se disocia del Arnt, se transloca al citosol donde es degradado por el proteosoma 26S. El represor del Ahr (Ahrr) suprime la actividad del Ahr por competencia al formar un heterodímero con Arnt [6].

El Ahr está altamente conservado tanto en los invertebrados como en los vertebrados. Estudios filogenéticos sugieren que el Ahr surgió hace aproximadamente 550 millones de años [7]. Se han identificado ortólogos funcionales del gen del *Ahr* en mamíferos, anfibios, reptiles y aves [8]. En mamíferos, el Ahr se expresa principalmente en hígado, pulmón, riñón, corazón,

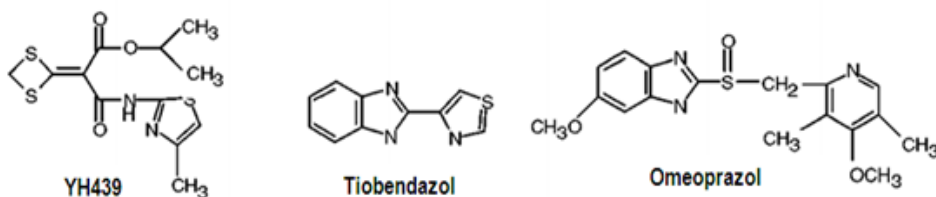
timo y mayoritariamente en placenta [9] aunque se ha detectado en una gran variedad de órganos, tejidos y células como cerebro, corazón, riñón, músculo, timo, bazo, macrófagos y linfocitos. El gen humano del *AHR* está localizado en el cromosoma 7p15 que codifican para una proteína de 848 aminoácidos con un peso molecular de 96 kDa, aproximadamente. Su ortólogo murino está localizado en el cromosoma 12 y codifica para una proteína de 805 aminoácidos con un peso molecular de 90 kDa [10].

Inicialmente, este factor de transcripción fue estudiado como parte de la respuesta adaptativa que presentan las células a la exposición a químicos y, particularmente, como un mediador de los efectos tóxicos provocados por contaminantes ambientales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs). Los ligandos del Ahr se pueden clasificar en 3 grupos: los clásicos que son los compuestos que fueron identificados por primera vez como ligandos de este factor de transcripción y que son PAHs y HAHs como el 3-meticolantreno, el benzo-[a] pireno, el TCDD, así como otros hidrocarburos polihalogenados y polibrominados. Es importante resaltar que el TCDD es el ligando con mayor afinidad por éste receptor. También encontramos el grupo de ligandos no-clásicos que son compuestos químicos de origen farmacéutico como el tiobendazol y el omeprazol y, finalmente, los compuestos de origen endógeno como la L-kinurenina, triptamina, ácido indol-acético y el ácido indol-pirúvico (Figura 3).

Ligandos "Clásicos" del AhR



Ligandos sintéticos "No-Clásicos" del AhR



Ligandos endógenos del AhR

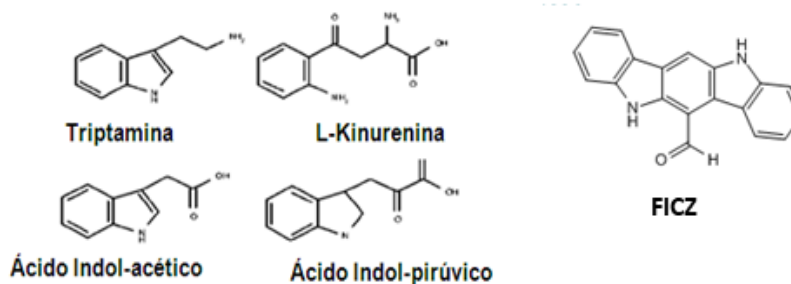


Figura 3. Ligandos del AhR.

El hecho de que el AhR presente un alto grado de conservación a través de las especies, de que presente una expresión constitutiva y que esta varía a través del desarrollo, ha llevado a hipotetizar que este factor de transcripción pudiera jugar un papel importante en la regulación de varios procesos celulares diferentes al del

metabolismo y la desintoxicación. Se han realizado estudios que demuestran la participación del Ahr en la diferenciación y proliferación celular, desarrollo [11], apoptosis [12], metabolismo del colesterol [13], y de la glucosa [14], neurogénesis y ritmo circadiano [2, 15-18], regulación del sistema ubiquitin-proteosoma [19-21] y en la homeostasis del Sistema Inmune [22-25]

1.2. El Sistema Inmune

El Sistema Inmune es el mecanismo de defensa del cuerpo en contra de sustancias extrañas o microorganismos como parásitos, bacterias y virus. A través de reacciones bien orquestadas llamadas en su conjunto respuesta inmune, el Sistema Inmune combate a agentes que invaden un organismo y causan enfermedades. Se encuentra conformado por células, tejidos y órganos que actúan en conjunto para proteger y preservar la integridad del organismo ante un número importante de estímulos antigénicos.

Toda respuesta inmune implica primero el reconocimiento del elemento patógeno o de una sustancia extraña al organismo y luego el desarrollo de una reacción destinada a eliminarlo. Las respuestas inmunológicas innatas (o inespecíficas) y las respuestas inmunitarias adaptativas (adquiridas o específicas) se llevan a cabo por diferentes tipos de células (Figura 4).

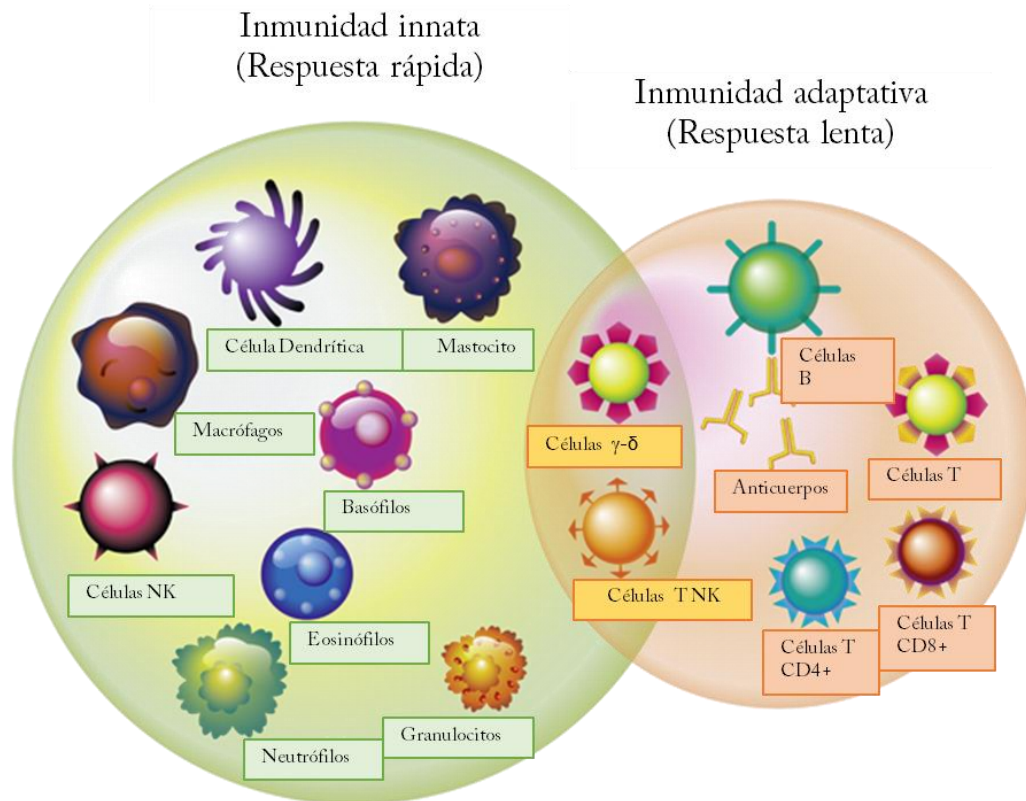


Figura 4. Células del Sistema Inmune.

La respuesta inmunitaria adaptativa o adquirida se establece después de días –en algunos casos semanas– tomando mucho más tiempo que la respuesta inmunitaria innata. Sin embargo, la inmunidad adaptativa es mucho más específica. Esta ocurre después de la exposición a un antígeno, ya sea un patógeno o una vacuna. Un antígeno es una molécula que estimula la respuesta del sistema inmunitario. Este tipo de respuesta se activa cuando la respuesta inmunitaria innata no es suficiente para controlar la infección. Sin la información del sistema inmunitario innato no se dispara la respuesta adaptativa. El Sistema Inmune adaptativo consta de dos ramas: la inmunidad celular y la inmunidad humoral. Los

efectores principales de la inmunidad celular son los linfocitos T, mientras que la inmunidad humoral se ve representada principalmente por linfocitos B. Los linfocitos T y B proceden de una célula madre común. (Inmunología celular y molecular, Abbas A.K., 7ª edición).

La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa en contra de infecciones por patógenos microbianos y está mediada principalmente por células de linaje mieloide, incluyendo granulocitos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) y macrófagos. Estas células son capaces de reconocer moléculas antigénicas presentes en patógenos a través de receptores, cuya especificidad es similar entre individuos diferentes. Dentro de los receptores celulares para el reconocimiento de patrones pertenecientes a la inmunidad innata, encontramos receptores fagocíticos, receptores de lectina tipo C, receptores de N-formil Met-Leu-Phe y receptores de tipo toll (TLR's) (Inmunología celular y molecular, Abbas A.K., 7ª edición).

1.2.1. Los macrófagos

En el presente trabajo se utilizó como modelo experimental a macrófagos peritoneales de ratón. Debido a ello, a continuación, se hace una breve descripción de estas células. Dentro del amplio número de células que intervienen en los distintos mecanismos de la respuesta inmunitaria, se encuentran los macrófagos. Estos pertenecen al sistema fagocítico mononuclear y la mayoría se originan en la médula ósea como monocitos. Una vez que se establecen en el tejido maduran para

diferenciarse a macrófagos. Se encuentran en todos los órganos y tejido conectivo y dependiendo de su ubicación reciben un nombre particular (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de macrófagos

Célula	Locación anatómica
Células de Kupffer	Hígado
Macrófagos alveolares	Pulmón
Células de Langerhans	Piel y Mucosa
Microglía	Sistema Nervioso Central
Osteoclastos	Hueso
Células de Hofbauer	Placenta
Monocitos	Médula Ósea/Sangre
Macrófagos Peritoneales	Cavidad Peritoneal

Los macrófagos son fundamentales en la respuesta inmune innata. Participan en la respuesta primaria hacia patógenos, pero también en la homeostasis de tejidos, la coordinación de la respuesta inmune adaptativa, la inflamación y la reparación, entre otras funciones. Llevan a cabo la fagocitosis de partículas extrañas como microbios, macromoléculas, antígenos e inclusive tejido dañado o muerto. También secretan especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y prostaglandinas que matan a los microbios. Presentan antígenos en su superficie (células presentadoras de antígenos) que son reconocidas por los linfocitos T. Además, producen citocinas, que a su vez provocan el reclutamiento de otras células inflamatorias como los neutrófilos y factores de crecimiento que promueven

la reparación de tejidos dañados. A su vez, los macrófagos pueden ser activados por citocinas secretadas por linfocitos T, lo que resulta en un desempeño más eficiente de la fagocitosis [26].

El reconocimiento de las moléculas antigénicas presentes en patógenos por parte de los macrófagos se lleva a cabo a través de receptores, en particular los receptores de tipo toll (TLRs, por sus siglas en inglés). Los TLRs son una familia de receptores de reconocimiento que se unen a componentes estructurales presentes en varios tipos de bacterias, virus, hongos y parásitos. Hasta el momento se han descrito 10 TLRs diferentes en humanos, los cuales difieren en los ligandos que reconocen, en el patrón de expresión y probablemente en los genes que inducen [27]. La activación de los distintos TLRs inicia varias vías de señalización seguida de la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IFN β , IL-8, entre otras), la activación del complemento, así como el incremento de la expresión de moléculas co-estimuladoras importantes para la activación de los linfocitos. En particular, los TLR4 son receptores que se encuentran en la membrana plasmática y reconocen lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, un componente integral de la membrana externa de bacterias Gram negativas, formado por un núcleo de oligosacáridos, una cadena O-específica, compuesta por secuencias repetidas de polisacáridos hidrofílicos, y un dominio hidrofóbico llamado lípido A que es el responsable de la actividad biológica.[28]. Varios de los efectos resultado de la activación de los TLRs, como el TLR4, están mediados por el factor nuclear Kappa B (NF- κ B, por sus siglas en inglés), un factor de transcripción ubicuo que juega un papel importante en la respuesta inmune.

1.2.2. El factor nuclear Kappa B

NF- κ B es un factor de transcripción pleiotrópico que tiene un papel central en el crecimiento celular, supervivencia, procesos de desarrollo, respuesta inmune, respuesta inflamatoria y apoptosis, entre otros [29, 30]. Fue descubierto en 1986 como un factor nuclear activado por lipopolisacáridos. Se observó que este factor se unía a una secuencia de 10 pares de bases de ADN en la región promotora asociada con la cadena ligera (κ) de las inmunoglobulinas derivadas de las células B [31]. NF- κ B es en realidad una familia de cinco miembros: c-Rel, [32], NF κ B1 (p105/p50) [5], RelA (p65) [33], NF κ B2 (p100/p52) [34], y RelB [35]. La forma más común de NF- κ B, encontrada virtualmente en todos los tipos celulares, está compuesta de dos subunidades: p50 y RelA (p65). Las sub unidades p50 y p52 permiten la unión al ADN. Por otro lado, RelA (p65), RelB y c-Rel son los responsables de la activación del gen [36]. La expresión génica puede ser regulada específicamente debido a que NF- κ B forma diferentes tipos de heterodímeros en diferentes tipos celulares. Estos se encuentran presentes normalmente en el citoplasma y su translocación nuclear ocurre cuando estímulos específicos como los lipopolisacáridos bacterianos provocan la degradación de su inhibidor I κ B por vía proteosomal permitiendo su translocación al núcleo como un homo o heterodímero (Figura 5). Estudios recientes sugieren que la subunidad p50 confiere la especificidad de unión al ADN y la subunidad RelA/p65 confiere la función de activación del complejo NF- κ B [37, 38]. Sin embargo, otros estudios indican que la proteína RelA/p65 puede asociarse al DNA en ausencia de p50 [35, 39].

La activación de NF- κ B es llevada cabo a partir de 2 vías de señalización conocidas comúnmente como clásica y alternativa. En la vía clásica, la señalización es iniciada por receptores TNFR, IL1R ó TLRs. Las señales son mediadas por las múltiples cinasas, resultando finalmente en la degradación de I κ B y permitiendo la translocación del homodímero RelA/p50 hacia el núcleo. En tanto que, en la vía alternativa, las señales son reconocidas por los receptores CD40, LT β R o BAFF-R, en dónde finalmente a través de la acción de distintas cinasas se lleva a cabo la translocación del dímero RelB/p52 al núcleo (Figura 5) [40].

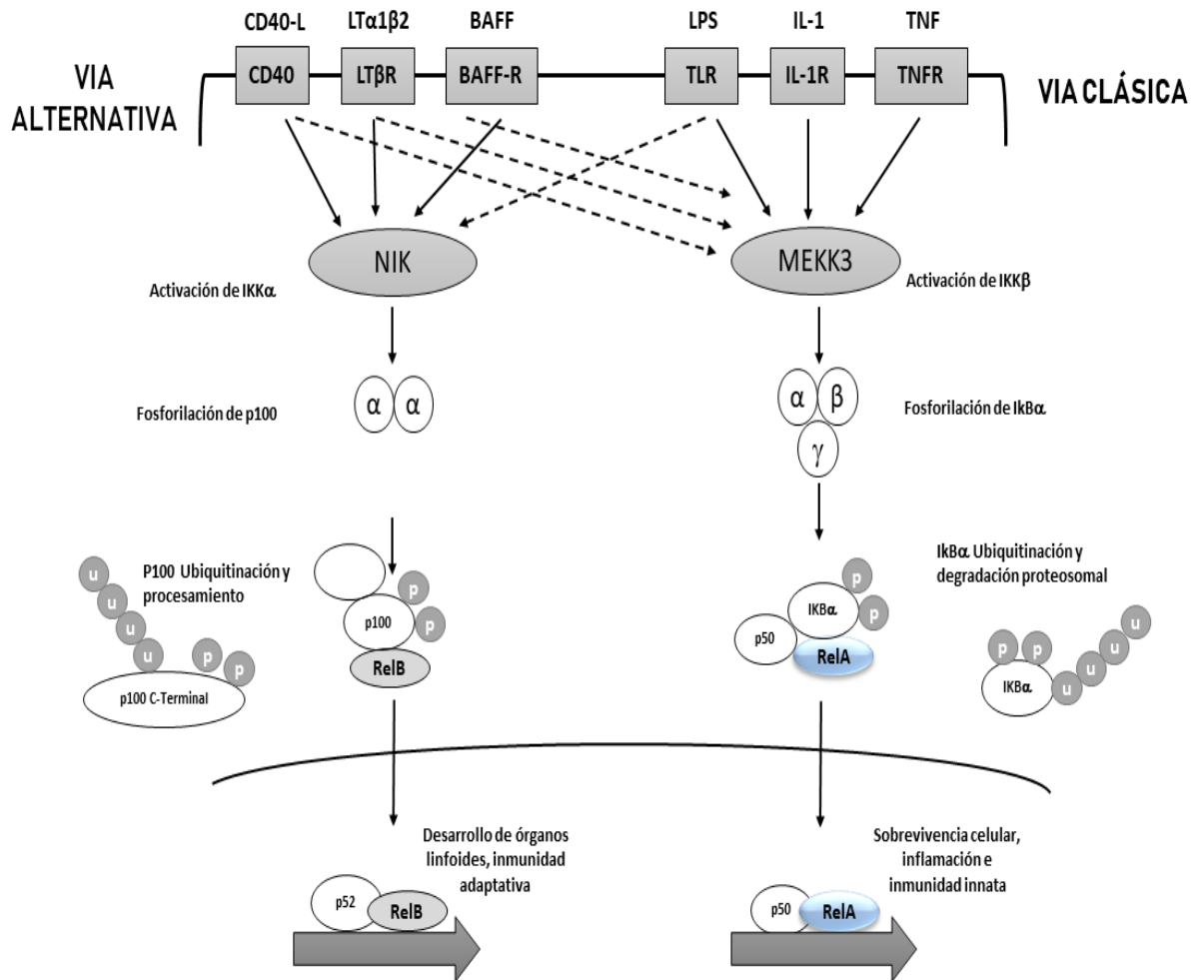


Figura 5. Vías de activación alternativa y clásica de NF- κ B.

La vía de señalización de NF- κ B regula la expresión de un gran número de genes proinflamatorios, incluidos citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Tabla 2) [41].

Tabla 2. Citocinas reguladas por NF- κ B.

Factor de necrosis tumoral	Quimiocinas
TNF- α	IL-8
TNF- β	MIP 1
Interleucinas	MCP 1
IL-1 β	Factor estimulador de colonias
IL-6	G CSF
IL-2	GM CSF
IL-12	Interferones
	IFN β

G-CSF (Factor estimulador de colonias de granulocitos), GM-CSF (Factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos), MCP (Proteína quimio táctica de macrófagos), MIP (Proteína inflamatoria de macrófagos).

1.3. El Sistema Inmune y el Ahr

Como se mencionó anteriormente, el Ahr es un factor de transcripción conocido sobre todo por su papel en la regulación del metabolismo de xenobióticos. Sin embargo, estudios recientes han encontrado que esta proteína juega un papel importante en varios aspectos de la función del Sistema Inmune. Las primeras evidencias que indicaron la posible participación de esta proteína en la regulación

del Sistema Inmune provienen de estudios en los que se observó que ligandos del Ahr, particularmente el TCDD, provocaban efectos inmunosupresores, en especial en la respuesta inmune adaptativa [42]. Actualmente, se sabe que la mayoría, si no es que todas las células que componen el Sistema Inmune, expresan al Ahr. Dentro de estas encontramos a los linfocitos T y B, macrófagos, células dendríticas, granulocitos y células NK, entre otras [43]. La información generada en la última década sugiere que la señalización por medio del Ahr juega un papel en el funcionamiento del Sistema Inmune tanto innato como adaptativo.

1.3.1. Ahr en el Sistema Inmune adaptativo

A la fecha existen diversos estudios, mediante el uso del TCDD, que indican que la activación del Ahr posee efectos inmunosupresivos, esencialmente alterando a todos los tipos celulares que median la inmunidad adaptativa. Desde hace décadas, varios estudios han mostrado que esta dioxina provoca la atrofia del timo en mamíferos debido a la muerte selectiva de linfocitos, así como la capacidad de suprimir la respuesta inmune adaptativa celular y humoral de muchas especies. [44, 45].

El desarrollo de ratones nulos para el receptor Ah ha sido de enorme utilidad para entender el posible papel que juega esta proteína en la regulación del Sistema Inmune. Numerosos defectos hematopoyéticos han sido descritos en modelos de ratones *Ahr*-nulos, incluyendo un número alterado de linfocitos en el bazo, hematopoyesis extramedular perinatal en el hígado y bazos agrandados [9, 46]. Mediante el uso de este modelo, se observó que la ausencia de este factor de

transcripción resulta en una reducción en el número de linfocitos T y B en el bazo, acompañado de un crecimiento exagerado de éste órgano debido a las células mieloides localizadas en la pulpa roja [47].

La piedra angular de la respuesta inmune adaptativa, probablemente, son las células T CD4+ las cuales adquieren distintos fenotipos a través de varias vías de señalización, dependiendo del antígeno presentado. Estas vías de señalización determinan la generación de células Th1, Th2, Th17 o células T reguladoras (Treg), las cuáles poseen papeles determinantes en la habilidad de otras células inmunes de responder al antígeno. Se han identificado varios factores de transcripción específicos que juegan un papel central en la diferenciación de las células Th. Estos incluyen Tbet para las células Th1, GATA-3 para las células Th2, RORc (γ t) para las células Th17 y FoxP3 para las células Treg. Algunos de los genes que codifican a estos factores de transcripción poseen elementos de respuesta a dioxinas (DREs) en sus regiones promotoras, tal es el caso de GATA-3 (10 DREs), Rorc(γ t) (4 DREs) y FoxP3 (5 DREs), lo cual los sitúa como blancos sujetos a una regulación a través de la activación del Ahr. En particular, se ha reportado que la expresión del gen *FoxP3* está regulada por el Ahr y que su activación mediante el uso de TCDD es capaz de inducir la diferenciación a células Treg las cuales promueven la supresión del Sistema Inmune [48]. Otros estudios han mostrado que el TCDD también suprime las respuestas alérgicas [49] y que es un potente inmunosupresor de enfermedades autoinmunes, incluida la encefalitis alérgica experimental [48], así como la diabetes tipo 1 [42]. Por otra parte, se han reportado estudios en donde linfocitos T de ratones *Ahr*-nulos muestran niveles elevados de IFN γ e IL-12 en

comparación con los ratones silvestres [24], reforzando así la idea del papel inmuno regulador de este receptor.

1.3.2. AhR en el Sistema Inmune innato

Los primeros estudios que vincularon al Ahr con el Sistema Inmune innato fueron aquellos en los que se reportó que el TCDD disminuye la toxicidad producida por lipopolisacáridos (LPS). La activación del Ahr por esta dioxina también produce neutrofilia, aunque los mecanismos que determinan este efecto se desconocen [50]. Por otra parte, los macrófagos, células fundamentales de la respuesta inmune innata, también han mostrado alteraciones en su actividad cuando se activa el Ahr. De acuerdo a algunos estudios, macrófagos de ratones *Ahr*-nulos muestran un aumento de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α e IL-12 al ser estimulados con LPS [51] y de IL1- β comparado con células de animales silvestres [52].

El Ahr también juega un papel en la vía de señalización de NF- κ B en macrófagos peritoneales activados. Se ha reportado que la sobreexpresión del Ahr en células RAW264.7 promueve la formación del complejo AhR-STAT1 que a su vez interactúa con el promotor del gen de *Il-6* lo que bloquea la interacción de NF- κ B con sus elementos de respuesta suprimiendo la expresión de esta citocina [51]. Por otro lado, en macrófagos alveolares, se observó que los ratones *Ahr*-nulos presentan un proceso inflamatorio exacerbado acompañado de una elevada actividad de NF- κ B comparado con los ratones silvestres, sugiriendo un rol negativo del Ahr sobre la función de NF- κ B [53].

El entrecruzamiento de las vías de señalización del Ahr y NF- κ B también fue observado en células Hepa1c1c7 por Tian y colaboradores. En este estudio, se muestra una interacción entre el Ahr y RelA lo que resulta en una represión funcional de la actividad del complejo Ahr/Arnt y una disminución de la expresión del cyp1a1 y cyp1a2 [54]. También se reportó, en células U937, la interacción física del Ahr con RelB, en donde la activación del receptor Ah por la proteína-quinasa A provoca su translocación al núcleo formando un heterodímero con RelB el cual reconoce elementos de respuesta (AhR/RelB) en el promotor de algunos genes como el de *IL-8*. [55].

Por otro lado, se ha mostrado que el Ahr tiene un papel relevante en el proceso de inflamación provocado por la infección por varios parásitos. Los ratones *Ahr*-nulos son más susceptibles a infecciones de *Listeria monocitogenes* [56]. Además, ratones *Ahr*-nulos infectados con *Leishmania major* o *Toxoplasma gondii* presentan niveles elevados de varias citocinas proinflamatorias como lo son IFN γ , IL-12 y TNF- α comparado con los ratones silvestres. Esta exacerbación en la respuesta inmune resulta en una mejor resolución de la infección por *L. major*. Sin embargo, cuando son infectados con *T. gondii* el resultado es una disminución en la sobrevivencia de los ratones [57, 58]. De manera similar, la administración de LPS provoca una mayor tasa de mortalidad en los ratones que no poseen al Ahr, en relación a los ratones silvestres [52].

El Ahr también juega un papel importante en la degradación de p53, c-fos y sinfilina-1 a través de la inducción de UbcH7, una proteína involucrada en sus ubiquitinaciones y degradaciones por el proteosoma 26S [19-21]. Por otro lado, se ha descrito al Ahr como una proteína que regula la degradación del receptor para estrógenos alfa, el receptor para andrógenos y la β catenina mediante su interacción con estas proteínas, funcionando como una enzima de tipo E3 ligasa dentro del complejo ubiquitinador para estos receptores [59, 60]. En su conjunto, lo anterior señala al Ahr como un regulador de la vida media de diversas proteínas, entre ellas factores de transcripción, a través de promover su ubiquitinación y degradación proteosomal. Por lo anterior, el Ahr pudiera regular los niveles proteicos de RelA/p65 utilizando los mecanismos anteriormente descritos.

2. JUSTIFICACIÓN

El Ahr es un factor de transcripción citosólico activado por ligando que media la toxicidad de contaminantes ambientales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y halogenados. Así mismo, existe evidencia de que el Ahr participa en la homeostasis del Sistema Inmune. En particular, su inactivación exacerba la respuesta inflamatoria. Sin embargo, hay poca información acerca de los mecanismos moleculares y las vías de señalización a través de las cuales el Ahr actúa. Debido a lo anterior, y a que alteraciones en el Sistema Inmune pueden resultar en severos daños a la salud, es importante estudiar y caracterizar dichos mecanismos.

3. HIPÓTESIS

La activación del Ahr resultará en un incremento en la ubiquitinación y degradación de RelA/p65 en macrófagos peritoneales de ratón.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar el mecanismo molecular a través del cual el Ahr produce la ubiquitinación y degradación proteosomal de RelA/p65 en macrófagos peritoneales de ratón.

4.2. Objetivos particulares

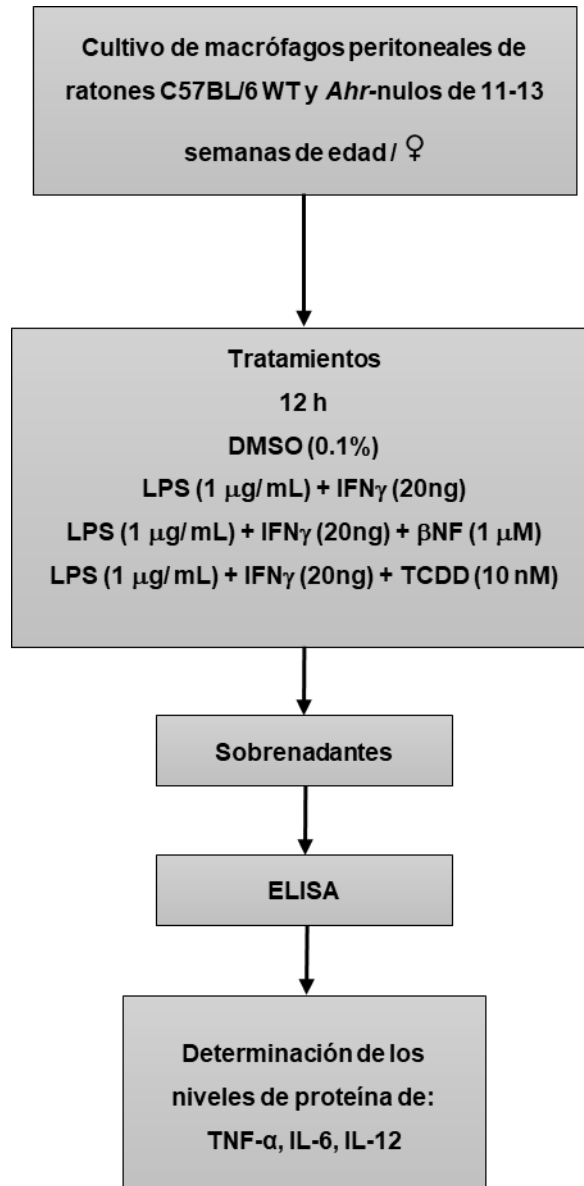
- Determinar si la reducción en los niveles proteicos de TNF- α , IL-6, IL-12 provocada por el tratamiento con TCDD y β NF es dependiente del Ahr.
- Determinar el efecto de la activación del Ahr sobre los niveles proteicos de RelA/p65.
- Evaluar si la degradación de RelA/p65 promovida por el Ahr es dependiente del proteosoma 26S.
- Evaluar si el tratamiento con TCDD promueve la ubiquitinación de RelA/p65.
- Evaluar si la ubiquitinación y degradación de RelA/p65 es dependiente de la actividad transcripcional del Ahr.
- Determinar si la activación del Ahr modifica la localización nuclear de P-RelA/p65 en macrófagos peritoneales de ratón.

- Determinar el efecto de la activación del Ahr en la formación de vacuolas y en la actividad lisosomal.
- Determinar si la activación del Ahr induce la expresión de *commd1*.

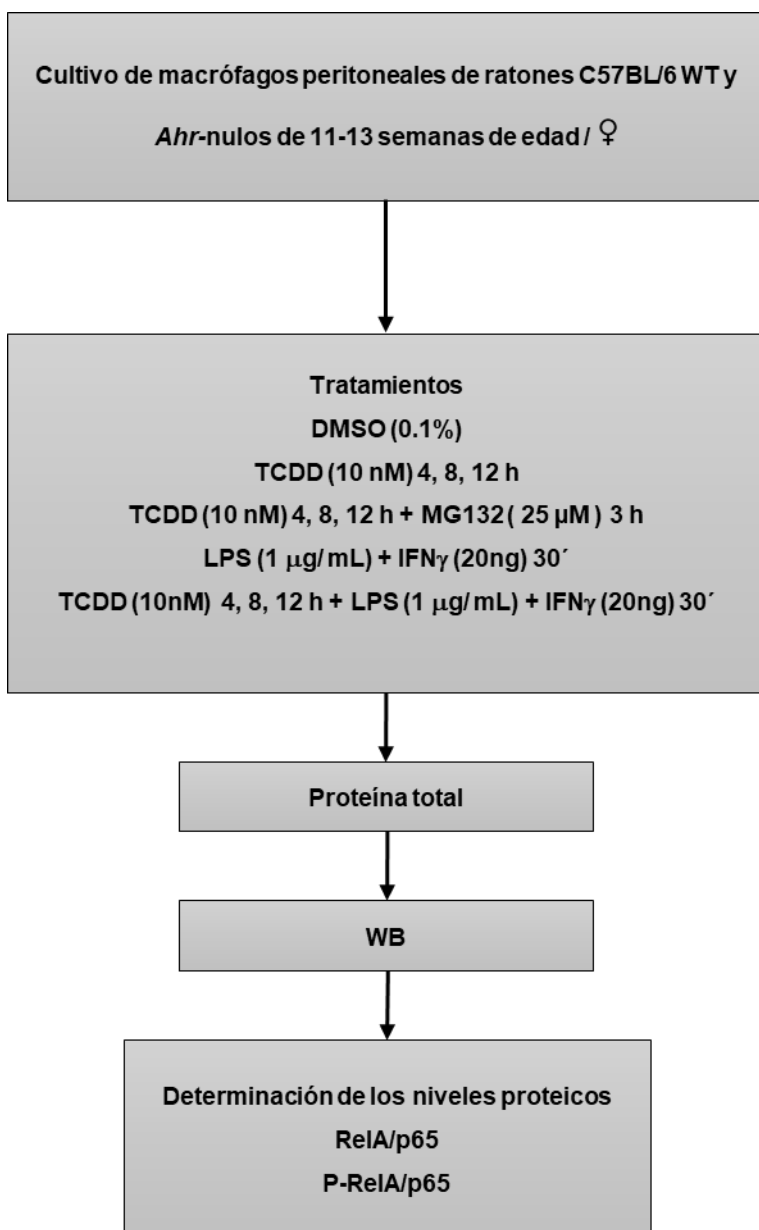
5. MÉTODOS

5.1. Diseño experimental

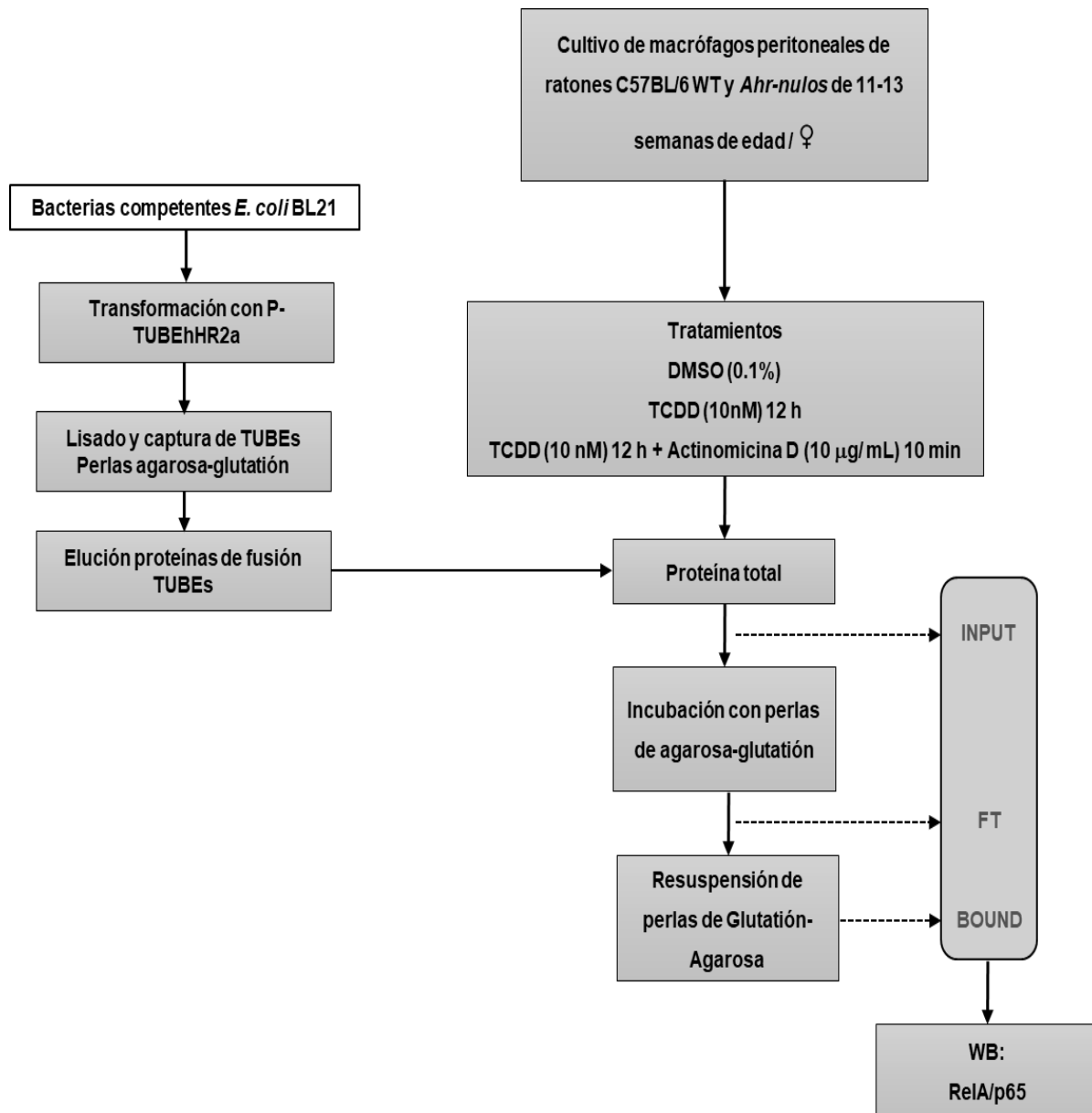
(a) Cuantificación de los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-12.



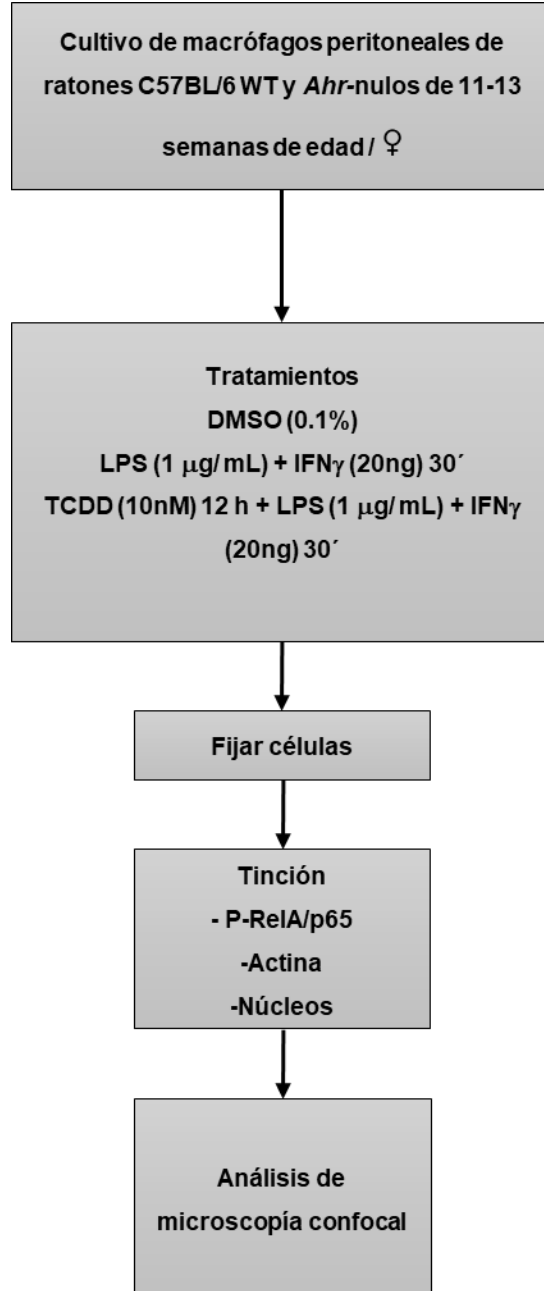
(b) Evaluación de los niveles proteicos de RelA/p65.



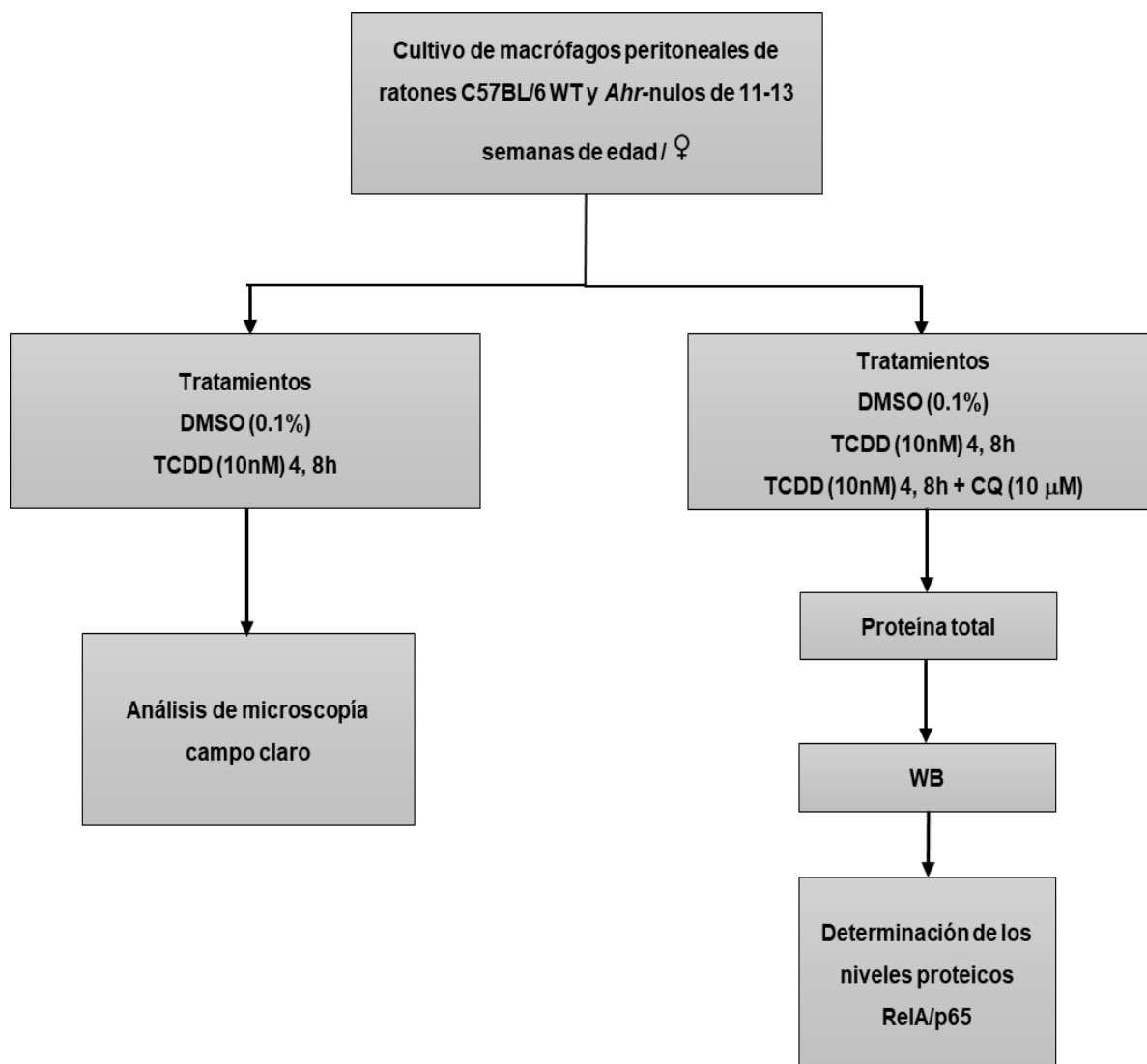
(c) Determinación de la ubiquitinación de RelA/p65.



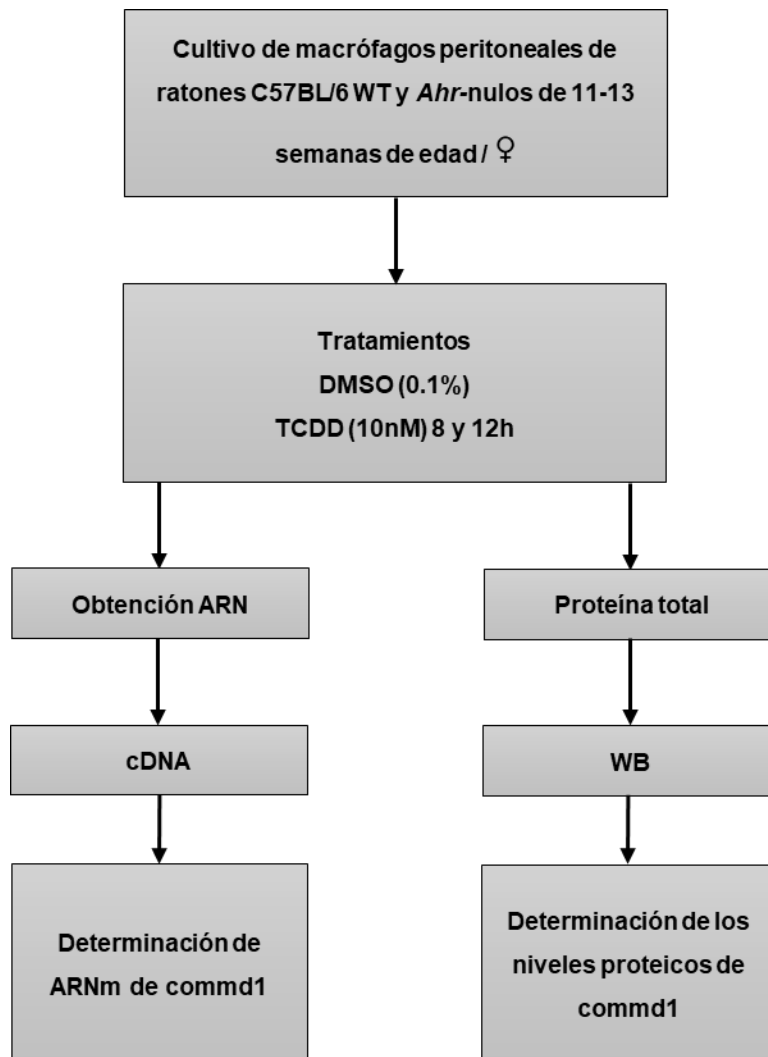
(d) Caracterización de la localización de P-RelA/p65.



(e) Evaluación de la formación de vesículas e inhibición de la actividad lisosomal.



(f) Cuantificación de *commd1*



5.2. Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 hembras de 10-13 semanas de edad alojados en el bioterio del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN. Los ratones fueron alimentados con agua esterilizada y alimento estándar libre de contaminantes *ad libitum*. Todos los procedimientos elaborados en este estudio fueron realizados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, adoptado por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y de la Regulación Mexicana del Cuidado y Mantenimiento Animal (NOM-062-ZOO-1999,2001).

5.3. Cultivo de macrófagos peritoneales

Los macrófagos peritoneales de ratón fueron obtenidos por lavado de la cavidad peritoneal con 9 mL de PBS frío con un masaje de 5 min. El contenido fue aspirado y las células fueron colectadas por centrifugación a 2,000 rpm por 10 min a 4 °C. Posteriormente, las células fueron lavadas y resuspendidas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1 mM L-Glutamina, 0.5% de aminoácidos no esenciales, 0.5% de piruvato de sodio, 100 U/ mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina para ser depositadas en placas de 12 pozos (3.8 cm² Corning®) a una concentración de 1×10^6 células por pozo. Los macrófagos fueron incubados a 37 °C en 5% CO por 2 h, lavados para remover las células no adherentes e incubados en medio RPMI suplementado medio fresco.

5.4. Tratamientos de los cultivos celulares

Los cultivos celulares fueron tratados, según fuera el caso, con dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 0.1%, lipopolisacárido (LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e interferón gama ($\text{IFN}\gamma$ 20ng) por 30 min, β -naftoflavona (βNF , 1 μM) por 4, 8 y 12 h, cloroquina (CQ, 10 μM) por 4 y 8 h, TCDD (10 nM) por 4, 8 y 12 h, MG132 (25 μM) por 3 h, actinomicina D (Act D, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 min. Los sobrenadantes se recolectaron en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL y fueron guardados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las células adheridas fueron recolectadas de los pozos con PBS frío, dejado en hielo 10 min para posteriormente ser raspadas con un pistilo y guardadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5. Determinación de los niveles proteínicos de las citocinas

Los niveles proteicos de las citocinas fueron determinados a través de ELISA.

Principio. La prueba inmunoenzimática ELISA tipo sandwich es un método altamente sensible que cuantifica citocinas u otros analitos en soluciones. Un anticuerpo monoclonal específico capaz de capturar a la citocina de interés se encuentra adherido a la superficie de una placa de microtitulación. Un segundo anticuerpo monoclonal, usado para la detección, se une a un diferente epítotope de la citocina. El anticuerpo de detección monoclonal es marcado con biotina, el cual permite su subsecuente unión a una enzima conjugada con estraptavidina. Cuando se adiciona un sustrato, se genera una reacción colorimétrica la cual es proporcional a la cantidad de citocina unida. La concentración de la citocina es

determinada por comparación con una curva estándar que tiene concentraciones conocidas de la citocina.

Procedimiento 1. La cuantificación de TNF- α e IL-6 se realizó bajo las especificaciones del proveedor del kit BD OptEIA™. Brevemente, sobre una placa de microtitulación de 96 pozos, se colocaron 50 μ L de ELISA diluent II por pozo, seguido de 50 μ L de la muestra estándar (curva) o 50 μ L de los sobrenadantes y se incubaron por 2 h en agitación a temperatura ambiente (TA). Una vez terminada la incubación, se dieron 5 lavados con buffer 1X, se adicionaron 100 μ L de anticuerpo de detección por muestra analizada y se incubaron por 1 h en agitación a TA. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con buffer 1X, se adicionaron 100 μ L del reactivo enzimático y se incubó por un tiempo de 30 min a TA. Se lavó 7 veces con buffer 1X y se adicionaron 100 μ L del reactivo TMB incubando la placa durante 30 min a TA en ausencia de luz. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 50 μ L de solución de paro por muestra analizada y se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm considerando una corrección de 570 nm con el uso de un MultiSkan FC ThermoScientific, Inc., Massachusetts, USA.

Procedimiento 2. La determinación de la citocina IL-12 se realizó bajo las especificaciones del proveedor del kit Biolegend ELISA MAX™ Deluxe Sets. Sobre una placa de micro-titulación de 96 pozos, se adicionaron 100 μ L de anticuerpo de captura y se dejó toda la noche en incubación a 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se dieron 4 lavados con 200 μ L de buffer (PBS-Tween al 0.05%) por pozo y se bloqueó con 200 μ L del buffer diluyente 1X con una incubación de 1 h con agitación a TA. Posteriormente, se lavaron 4 veces con buffer y se adicionaron 100

μL de las muestras estándar (curva) o 100 μL de los sobrenadantes. La placa se incubó por un tiempo de 2 h con agitación a TA. Transcurrido el tiempo se realizaron 4 lavados con buffer y se adicionaron 100 μL de anticuerpo de detección incubando la placa por 1 h en agitación a TA. Posteriormente, se realizaron 4 lavados y se adicionaron 100 μL de la solución de avidina-HRP y se incubó por 30 min a TA. Se adicionaron 100 μL de la solución substrato D y se incubó por 15 min a TA en ausencia de luz. Finalmente, se detuvo la reacción con 100 μL de solución de paro y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm considerando una corrección de 570 nm con el uso MultiSkan FC (ThermoScientific, Inc., Massachusetts, USA).

5.6. Western blot

Principio. La técnica de western blot es empleada para identificar proteínas específicas de una mezcla de proteínas obtenida a partir de extractos celulares. La técnica usa 3 elementos para completar la prueba: separación por tamaño, transferencia a un soporte sólido y el marcaje de la proteína de interés usando un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario para visualizarla.

Procedimiento. Los extractos proteicos se obtuvieron agregando 200 μL de buffer de lisis (50 mM TRIS-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA pH 7.4, NP-40 1%, $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NAO}_4$ 1%, 10mM NaF, 10mM Na_3VO_4 , 1mM EGTA, 20mM $\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) a las células y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó por el método de Bradford. Primero se realizó una

curva estándar de BSA. Se preparó una solución stock de BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en PBS. Se colocaron en el primer pozo 10 μL de BSA (10 μg) y 310 μL de PBS, para completar un volumen final de 320 μL . En los siguientes 5 pozos (segundo al sexto) se colocaron 160 μL de PBS y, a partir del primer pozo, se realizaron diluciones dobles seriadas obteniendo 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 μg de BSA, respectivamente. El séptimo pozo contiene únicamente PBS y sirve como blanco. Se adicionaron 40 μL del reactivo de Bradford 5X a cada pozo y se mezclaron perfectamente. Posteriormente, en un volumen de 160 μL se realizó una dilución 1:200 de cada muestra y se colocó en la placa de 96 pozos, para después adicionar a cada pozo 40 μL del reactivo de Bradford 5X (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se mezclaron perfectamente. La placa de 96 pozos, que contiene la curva estándar de BSA y las muestras, se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la concentración de proteína total en cada muestra.

Se usaron geles de acrilamida SDS-PAGE al 10% para la separación de proteínas. Se utilizaron 40 μg de proteína a la que se le agregó buffer de carga para proteínas. La muestra se hirvió durante 5 min para posteriormente incubarla en hielo por 2 min. Las muestras fueron cargadas en el gel y se realizó la electroforesis por 4 h a 100 V. La proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara de transferencia (Bio-Rad, Hercules, CA) a 4 $^{\circ}\text{C}$, a 0.2 amperios durante 2 h. Cumplida la transferencia, las membranas fueron incubadas con una solución de bloqueo (BSA-leche descremada) durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a una

dilución 1:500, anti-P-p65 (Cell Signaling Technology, DanversMA, USA) a una dilución 1:500, anti-commd1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a una dilución 1:500 durante toda la noche a 4 °C y anti-actina (Zymed, San Francisco,CA, USA) 1:500 durante 4 h a 4 °C. Después de lavar las membranas con una solución TBS-Tween al 0.1% y TBS por periodos de tiempo de 15, 10 y 5 min, se realizó una incubación con el anticuerpo secundario correspondiente. Por último, se lavó la membrana y se detectó la proteína por inmunoreactividad haciendo uso del kit Clarity Western ECL substrat (BioRad, Hercules, CA, USA).

5.7. Microscopía confocal

Principio. La técnica de microscopía confocal es un método especializado de microscopía de fluorescencia que usa componentes ópticos particulares para generar imágenes de alta resolución de muestras teñidas con sondas fluorescentes. Esta técnica captura imágenes de dos dimensiones en diferentes planos de una muestra lo que permite la reconstrucción de estructuras tridimensionales (proceso conocido como seccionamiento óptico).

Procedimiento. Se cultivaron macrófagos (1×10^5 células) en cubreobjetos estériles, se retiró el medio y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 15 min a TA. Posteriormente, se llevaron a cabo lavados con PBS 1X y se permeabilizaron las muestras con Tritón X-100 al 0.05% durante 5 min, se lavó y se bloqueó la muestra con BSA al 5% durante 1 h. Cumplido este tiempo, se incubó con el anticuerpo primario anti-P-RelA/p65 (Cell Signaling Technology, DanversMA, USA)

a una dilución 1:50 durante 2 h para después lavar y adicionar el anticuerpo secundario anti-rabbit FITC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA) a una dilución 1:100 durante 2 h en obscuridad. Las muestras se lavaron 6 veces con PBS-Tween al 0.1% y 6 veces con PBS 1X y se dejaron secar en obscuridad por 30 min. Finalmente, se adicionó 1.5 mL de Vecta Shield y las muestras se colocaron en cubreobjetos para ser guardadas a -4 °C.

5.8. Obtención de las TUBES

La obtención de las TUBEs (Tandem Ubiquitin Binding Entities) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Aillet y colaboradores en 2012 [61]. Brevemente, se adicionaron 100 ng de plásmido hHR23A, purificado previamente por midiprep, a 50 µL de bacterias competentes DH5α, la mezcla se colocó en un baño a 42 °C por 45 s y posteriormente en hielo por 2 min. Finalizado el tiempo, se adicionaron 500 µL de medio LB (sin antibiótico) y se incubó por 1 h a TA. A continuación, se sembraron 250 µL en placas LB-agar-ampicilina y se incubaron a 37° C toda la noche. Al siguiente día, se seleccionaron las colonias y se crecieron en 200 mL de medio LB por 16 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de crecimiento, los 200 mL se aforaron a 1 Lt de medio LB con ampicilina y se adicionó anti-foam a una concentración final de 0.01 %, se creció hasta llegar a una densidad óptica (O.D.) de 0.7 a 37 °C. Alcanzada la O.D., se adicionó 1 mL de IPTG 1 M y se creció por 6 h a 20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 6,000 rpm, por 10 min a 4 °C y se re suspendió el pellet formado en 20 mL de PBS frío. Se volvió a centrifugar a las condiciones antes mencionadas.

El sobrenadante obtenido se descartó y se resuspendió el pellet en 15 mL de PBS que contenía 2 mM de benzamidina, después, la muestra se sonicó y se añadió Tritón X-100 a una concentración final de 1%. El lisado se centrifugó por 2 h a 20,000 rpm a 4 °C. Posteriormente, se adicionó 1 mL de perlas glutatión-agarosa y se permitió la interacción por 2 h a 4 °C con agitación constante. El lisado se eluyó con un buffer de elución que contenía Tris 50 mM y glutatión reducido 10 mM a pH 9.5 (se realizaron 4 eluciones con 1 mL de buffer de elución cada una). Finalmente, la muestra se concentró usando columnas Amicon de 3 KDa y se cuantificó mediante el método de Bradford.

5.9. Ensayos de ubiquitinación

La determinación de la ubiquitinación de RelA/p65 se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Se obtuvieron extractos celulares usando 500 µL de buffer de lisis (50 mM de fluoruro de sodio, 5 mM de pirofosfato de sodio, 10 mM de glicerol-2-fosfato, 0.2 % Nonidet-P40, 2 mM de EDTA, 20 mM de Na₂HPO₄, 20 mM de NaH₂PO₄, 1 mM de PMSF, y una tableta de inhibidor de proteasas o minicomplete a pH 7.5) suplementado con 100 µg de las trampas de ubiquitina (Tandem Ubiquitin Binding Entities o TUBEs), obtenidas como se describió previamente. Posteriormente, el lisado se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C y se tomó una alícuota de 50 µL correspondiente a la fracción "Input". Se adicionaron 100 µL de perlas de glutatión-agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 5 µL de DTT 0.1 M y se incubó con agitación constante por 12 h. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C

y se tomó una alícuota de 50 μ L correspondiente a la fracción “Flow Throught” (FT). Finalmente, el pellet obtenido del paso anterior, correspondiente a la fracción “Bound” se lavó 3 veces con 1 mL de Tween-20 al 0.05%. Las fracciones se cargaron en geles de SDS-PAGE y se detectaron los niveles de p65 ubiquitinado por western blot.

5.10. Extracción de ARN total

Principio. El kit Rneasy® Mini Kit basa su procedimiento en las propiedades selectivas de unión del ARN a una membrana de silica-gel a través del empleo de múltiples centrifugaciones. Las muestras biológicas son lisadas y homogeneizadas en presencia de un buffer que contiene isotiocianato de guanidinio, el cual inactiva RNAsas para asegurar la integridad del ARN aislado. Se adiciona etanol para mantener condiciones apropiadas de unión y la muestra se coloca en una columna en donde el ARN total se une a la membrana y los residuos son retirados de manera eficiente.

Procedimiento. La extracción de ARN se realizó bajo las especificaciones del kit Rneasy® Mini Kit (Cat. No. 74104, Quiagen, Hilden, Germany). Una vez cumplido los tiempos de incubación de los distintos tratamientos, se retiró el sobrenadante. Se agregaron 600 μ L de buffer RLT (lisis) y la suspensión se homogeneizó pasando las células por jeringas calibre 20 (0.9 mm aguja) en 10 repeticiones. Se adicionó el lisado en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL, se agregó 1 volumen de etanol al 70% y se homogeneizó por pipeteo. La muestra se transfirió (incluyendo

precipitados) a columnas de 2 mL y se centrifugó 15 s a 12,000 rpm. Se desechó el flujo del centrifugado. Posteriormente, se adicionaron 700 μ L de buffer RW1 a la columna seguido de una centrifugación por 15 s a 12,000 rpm desechando el volumen del centrifugado. Se adicionaron 500 μ L de buffer RPE a la columna y se centrifugó durante 2 min a 12,000 rpm. Se retiró cuidadosamente la columna y se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2 mL en donde fue centrifugada durante 1 min a máxima velocidad (15,000 rpm). La columna se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2 mL y se adicionaron 30 μ L de H₂O libre de RNAsa y se incubó por 10 min. Posteriormente, se centrifugó durante 90 s a 12,000 rpm. Las muestras se guardaron a -70 °C hasta ser usadas. Para evaluar la integridad del ARN se realizó un corrimiento electroforético de las muestras (1 μ L) en geles de agarosa al 1% con TBE como buffer durante 1 h a 100 V. El ARN se visualizó con una tinción con bromuro de etidio. Se corroboró la integridad del ARN por la observación de las bandas correspondientes a las subunidades 28s y 18s del ARN ribosomal en un transiluminador UV. La cuantificación del ARN se realizó usando el dispositivo Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific Inc., Massachusetts, USA) siguiendo las especificaciones de uso del proveedor, de donde se obtuvo la concentración de ácido nucleico y su pureza dada por la relación de absorbancia 260 nm/280 nm. Valores en el rango de 1.8-2.0 fueron considerados como ARN puro (Davenport, 2005).

5.11. Síntesis de cDNA

Principio. El cDNA se obtiene a partir de una cadena de ARNm. Esta conversión es obtenida a partir de la acción de una transcriptasa reversa la cual produce una cadena de ADN complementaria, basada en la secuencia original de ARN.

Procedimiento. En un tubo de PCR se adicionaron 1 μL de Random primers [250 ng/ μL], 1 μg de ARN y agua DEPC para ajustar a un volumen final de 14 μL . Las muestras se colocaron en un termociclador y se desnaturalizaron por 5 min a 65 °C. Finalizado el tiempo, se colocaron en hielo por 2 min. Posteriormente, se adicionó a cada muestra 6.5 μL de una mezcla de reacción que contenía 4 μL de Buffer 5X, 1 μL de DTT 0.1 M, 1 μL de dNTPs 10 mM y 0.5 μL de enzima RT SuperScript First-Strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se realizó una PCR con las muestras por 40 min a 50 °C. Al término, las muestras se almacenan a -70 °C hasta su uso.

5.12. Determinación de niveles de ARNm por PCR cuantitativo

Principio. La técnica de PCR cuantitativo (qPCR) detecta la expresión de un gen por la presencia de ARNm. La qPCR se realiza en un termociclador con la capacidad de incidir sobre la muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado/degradado. La actividad nucleolítica 5' de la enzima Taq polimerasa escinde una sonda marcada, la cual separa espacialmente un fluorocromo reportero 5' del fluorocromo quencher, lo cual resulta en un incremento en la emisión de fluorescencia. Los datos obtenidos

son introducidos en un esquema de amplificación [62]. De este modo se calcula el valor de CT (ciclo en el cual la fluorescencia de la muestra supera el umbral) basado en el tiempo en el cual la emisión del fluorocromo reportero se incrementa por encima de la fluorescencia perteneciente al sistema [63]. El valor de CT se correlaciona entonces con el número de copias de ARNm en la muestra [64].

Procedimiento Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) y los niveles de amplificación fueron analizados usando el umbral de expresión correspondiente (CT). Se amplificaron los cDNA correspondientes a los genes *commd1*, *cyp1a1* y *18S* ribosomal (ARNr endógeno) en una reacción sencilla de PCR. El gen endógeno fue utilizado como valor para normalizar la expresión. La reacción de qPCR contenía 2 μ L de cDNA, 7.5 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA), 6.1 μ L de agua inyectable y 0.4 μ L de las sondas correspondientes. Las sondas usadas para *commd1*, *cyp1a1* y *18S* fueron obtenidas de Applied Biosystems (Branchburg, NJ, USA) con los siguientes números de identificación (ID): Mm01239669_m1, Mm00487218_m1 y Mm00507222_s1, respectivamente.

5.13. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio \pm de la desviación estándar (D.E.). La significancia estadística fue evaluada usando la prueba de t de Student. En todos los casos, la diferencia entre grupos fue considerada estadísticamente significativa cuando el valor de p fue menor a 0.05.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación del efecto de la activación del Ahr sobre los niveles proteicos de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-12 en macrófagos peritoneales de ratón.

Resultados previos han demostrado que el Ahr juega un papel sobre la secreción de citocinas en distintos modelos celulares [25, 51, 52]. Del mismo modo, en el presente estudio, se encontró que el tratamiento con agonistas del Ahr, β NF y TCDD, provoca una disminución en los niveles de varias citocinas proinflamatorias en macrófagos peritoneales de ratón activados con LPS/IFN γ (Figura 6). Para determinar si este efecto era dependiente del Ahr, se utilizaron macrófagos peritoneales de ratones *Ahr*-nulos y se trataron bajo las mismas condiciones. Como puede observarse en la figura 7, tanto el tratamiento con β NF como con TCDD, a diferencia a lo observado en macrófagos silvestres, no generó una disminución en los niveles de las citocinas pro inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-12 en los macrófagos *Ahr*-nulos.

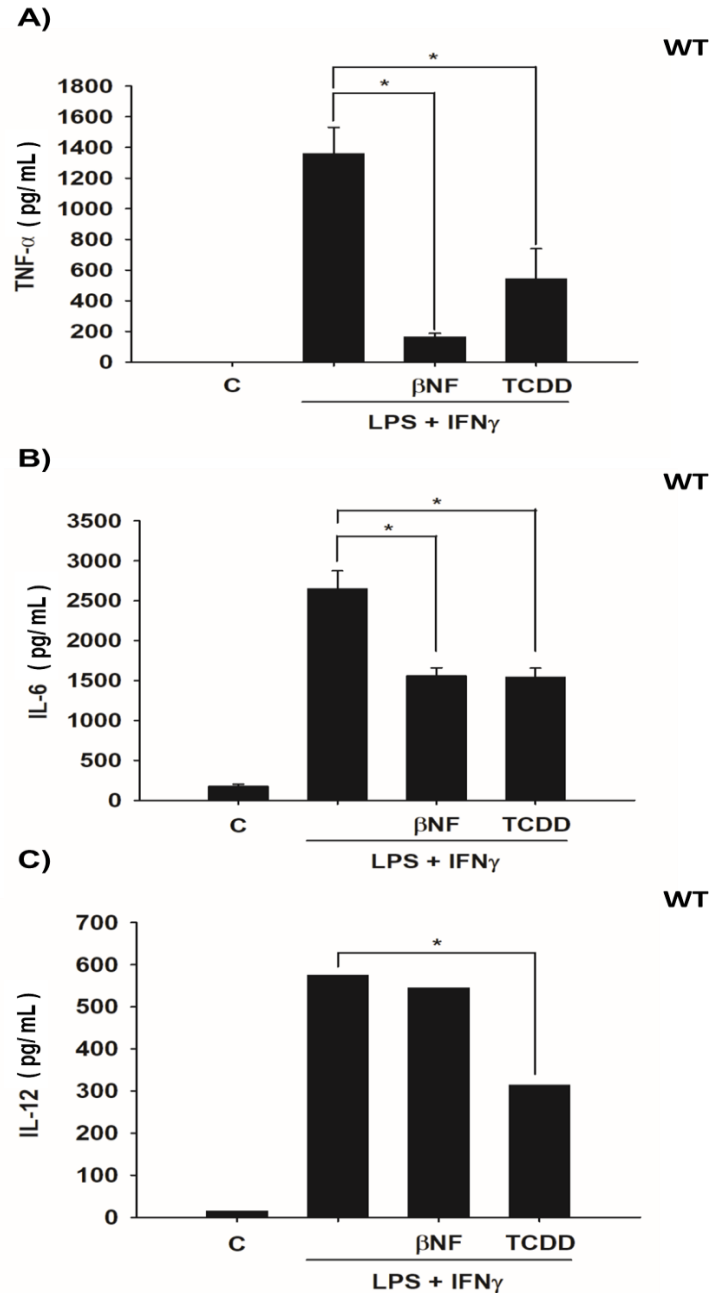


Figura 6. El TCDD y la β NF disminuyen los niveles proteicos del TNF- α , IL-6 e IL-12 en macrófagos peritoneales de ratón. Macrófagos peritoneales de ratones silvestres (WT, 1×10^6 células) fueron tratados con DMSO como control, LPS + IFN γ (1 μ g/mL y 20 ng, respectivamente), LPS + IFN γ + β NF (1 μ g/mL, 20 ng y 1 μ M, respectivamente) o LPS + IFN γ + TCDD (1 μ g/mL, 20 ng y 10 nM, respectivamente) por 12 h. Posterior al tratamiento, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluaron los niveles de TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-12 (C) mediante ELISA. Los datos representan el promedio \pm D.S. de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. LPS+IFN γ .

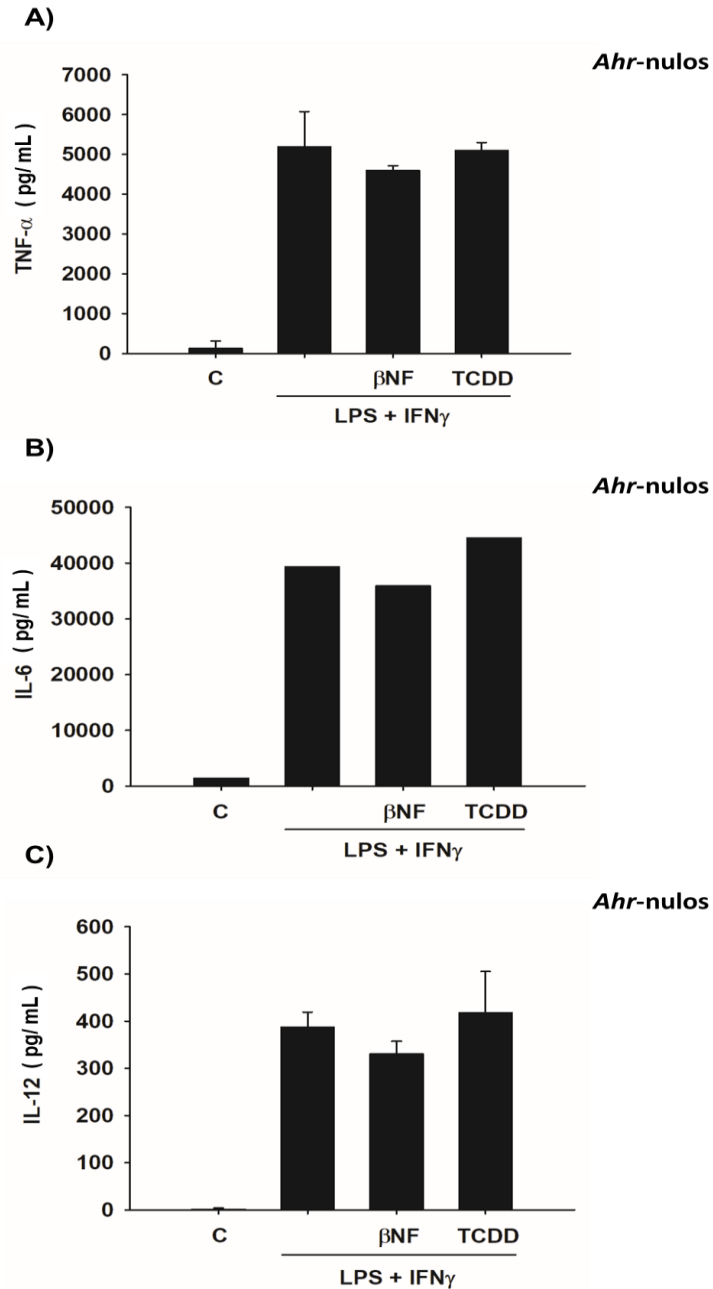


Figura 7. El TCDD y la β NF no modifican los niveles proteicos del TNF- α , IL-6 e IL-12 en macrófagos peritoneales de ratón *Ahr-nulos*. Macrófagos peritoneales de ratones *Ahr-nulos* (1×10^6 células) fueron tratados con DMSO como control, LPS + IFN γ (1 μ g/mL y 20 ng, respectivamente), LPS + IFN γ + β NF (1 μ g/mL, 20 ng y 1 μ M, respectivamente) o LPS + IFN γ + TCDD (1 μ g/mL, 20 ng y 10 nM, respectivamente) por 12 h. Posterior al tratamiento, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluaron los niveles de TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-12 (C) mediante ELISA. Los datos representan el promedio \pm D.S. de 3 experimentos independientes.

6.2. La activación del Ahr promueve la degradación proteosomal de RelA/p65

NF- κ B es un factor de transcripción involucrado en distintos procesos celulares. Es responsable de la expresión de factores angiogénicos, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y de la expresión de citocinas proinflamatorias [65]. Varios estudios han descrito la interacción de NF- κ B (RelA/p65) y el Ahr en varios modelos celulares [54, 66]. Por otro lado, se ha identificado al Ahr como un promotor de la degradación proteosomal de diversos factores de transcripción [19-21, 59, 60]. Por lo anterior, se evaluó si la activación del Ahr modifica los niveles proteicos de NF- κ B. Para ello, se trataron a los macrófagos peritoneales con TCDD (10 nM) por 4, 8 y 12 h y se evaluaron los niveles proteicos de RelA/p65 por western blot. El tratamiento con TCDD disminuyó de un 30 a un 40% los niveles proteicos en los tiempos anteriormente indicados de manera dependiente del Ahr (Figura 8A y 8B). El TCDD induce la degradación de RelA/p65 de manera incompleta, probablemente debido a que RelA/p65 presenta una tasa de recambio dinámica, con una vida media de 6 h [67]. Por lo anterior, se examinó si la inhibición de la síntesis *de novo* de la proteína exacerbaba la degradación de RelA/p65 provocada por la activación del Ahr. El tratamiento con TCDD por 4, 8 y 12 h seguido de un tratamiento con cicloheximida mostró una disminución significativa de los niveles de RelA/p65 desde las 4 h y no se detectó a la proteína a las 8 y 12 h (Figura 8C).

Con el objetivo de determinar si la disminución observada en los niveles proteicos de RelA/p65 esta mediada por una degradación dependiente del proteosoma 26S, macrófagos peritoneales fueron co-tratados con TCDD por 4, 8 y 12 h y MG132, un inhibidor del proteosoma 26S, por 3 h. Como se muestra en la

figura 8D, no se observaron cambios significativos en los niveles proteicos de RelA/p65, lo que indica que efectivamente, la degradación de este factor de transcripción esta mediada por la vía proteosomal.

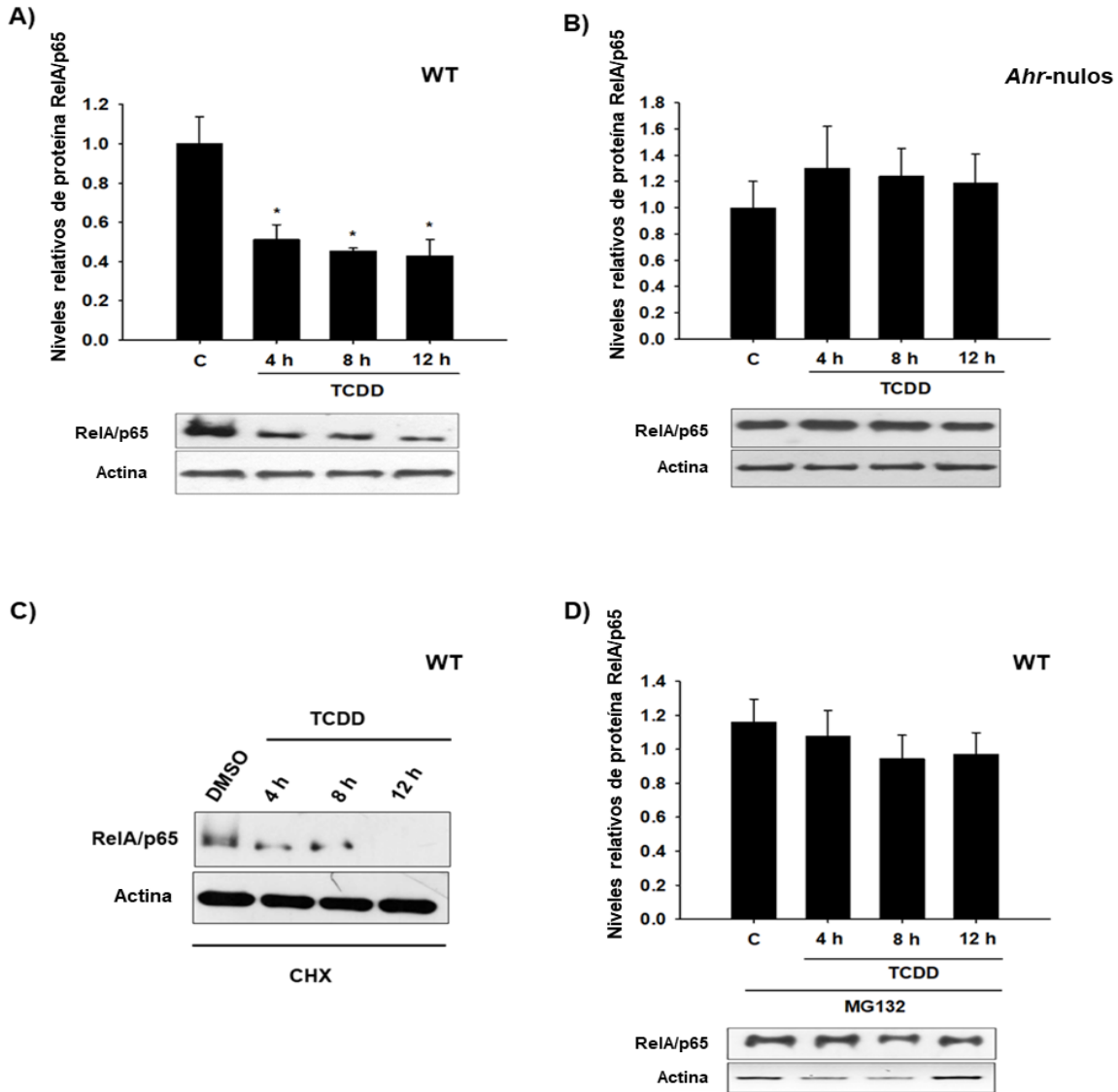


Figura 8. El Ahr promueve La degradación proteosomal de RelA/p65. Macrófagos peritoneales (1×10^6 células) de ratones silvestres (WT) (A) y *Ahr*-nulos (B) fueron tratados con 10 nM de TCDD. (C) Macrófagos peritoneales de ratones silvestres fueron co-tratados con 10 nM de TCDD y con cicloheximida (CHX, 10 μ g/mL) por 6 h para inhibir la síntesis *de novo* de proteínas. (D) Macrófagos peritoneales de ratones silvestres fueron co-tratados con 10 nM de TCDD y MG132 (25 μ M) a los tiempos indicados. Los niveles de proteína de RelA/p65 se determinaron por western blot. Se muestran blots representativos y los resultados de densitometría. El DMSO fue usado como control y los niveles de proteína fueron normalizados con actina. Los resultados se expresan como el promedio de \pm D.E. de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, tratamientos vs. control (C).

6.3. La activación del Ahr promueve la ubiquitinación de RelA/p65

La identificación de la proteína blanco por el proteosoma 26S requiere que ésta sea previamente marcada por una cadena de poli-ubiquitinas. Debido a que la degradación de RelA/p65 es dependiente del proteosoma 26S, se decidió evaluar si el tratamiento con TCDD promueve la ubiquitinación de RelA/p65 y si dicho efecto está mediado por el Ahr. Para ello, macrófagos peritoneales fueron tratados con TCDD (10 nM) por 4, 8 y 12 h, y mediante el uso de TUBEs se capturaron las diversas formas de RelA/p65 ubiquitinado. Como se muestra en la figura 9, el tratamiento con TCDD incrementó los niveles de ubiquitinación de RelA/p65 a las 12 h comparado con su control.

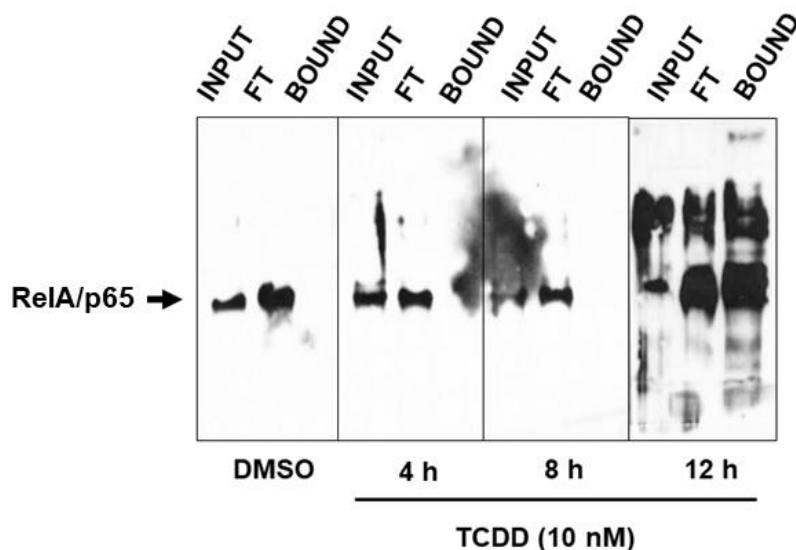


Figura 9. La activación del Ahr promueve la ubiquitinación de RelA/p65. Macrófagos peritoneales de ratones silvestres fueron tratados con TCDD (10 nM) a los tiempos indicados. Posterior al tratamiento, se obtuvieron extractos proteicos y se capturaron las proteínas ubiquitinadas mediante el uso de TUBEs. Los niveles de RelA/p65 ubiquitinado se determinaron por western blot. El DMSO fue utilizado como control. Se analizaron las fracciones Input, Flow Through y Bound. Se muestran blots representativos de 3 experimentos independientes.

Para determinar si el incremento en la ubiquitinación de RelA/p65 provocado por el TCDD a las 12 h es dependiente del Ahr, macrófagos peritoneales de ratones *Ahr*-nulos fueron tratados con el agonista del receptor. En contraste con los macrófagos del ratón WT, el tratamiento con TCDD no resultó en un incremento en los niveles de ubiquitinación (Figura 10), indicando que dicho fenómeno es dependiente del Ahr. Además, la ubiquitinación de RelA/p65 promovida por la activación del Ahr depende a su vez de su actividad transcripcional, ya que el pre-tratamiento con TCDD y actinomicina D (Figura 11) bloquea la ubiquitinación observada.

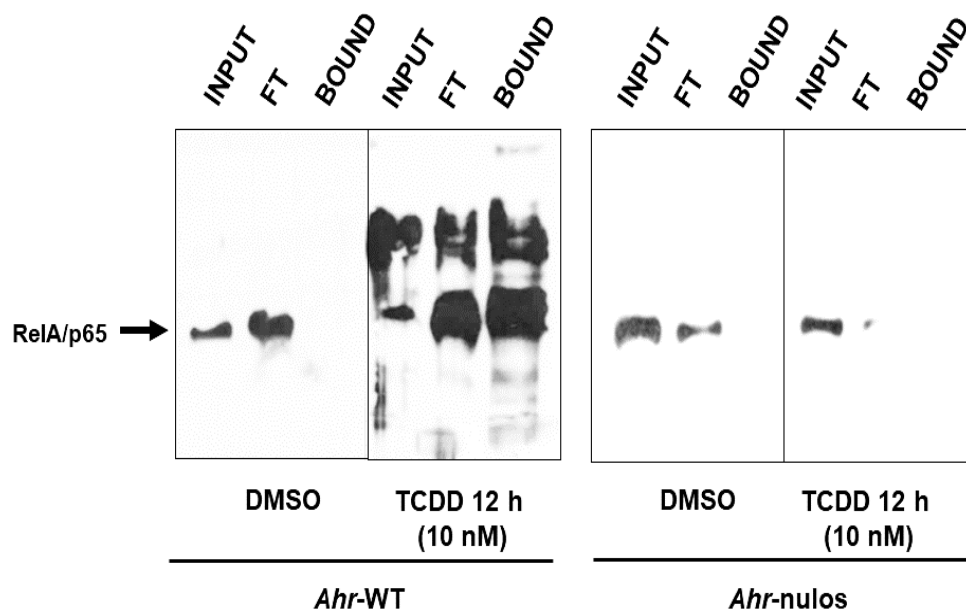
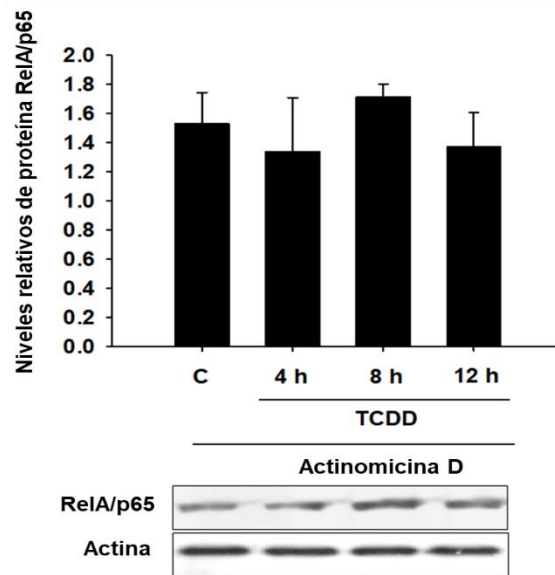


Figura 10. La ubiquitinación de RelA/p65 es dependiente del Ahr. Macrófagos peritoneales de ratones silvestres y *Ahr*-nulos fueron tratados con TCDD (10 nM) a los tiempos indicados. Posterior al tratamiento, se obtuvieron extractos proteicos y se capturaron las proteínas ubiquitinadas mediante el uso de TUBEs. Los niveles de RelA/p65 ubiquitinado se determinaron por western blot. El DMSO fue utilizado como control. Se analizaron las fracciones Input, Flow Through y Bound. Se muestran blots representativos de 3 experimentos independientes.

A)



B)

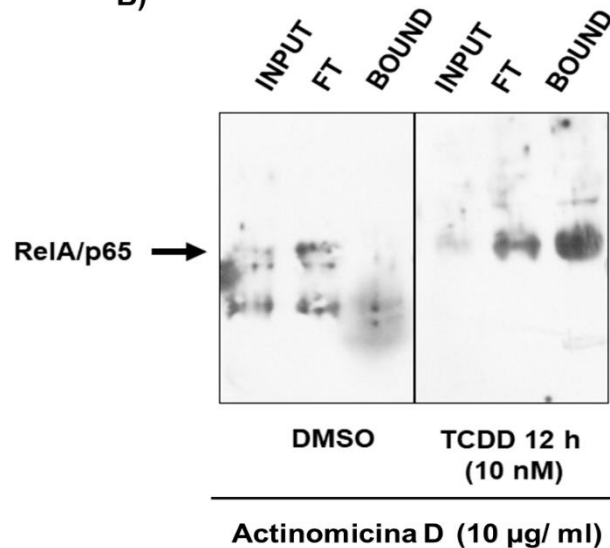


Figura 11. La ubiquitinación de RelA/p65 es dependiente de la actividad transcripcional. Macrófagos peritoneales de ratones silvestres fueron pretratados con actinomicina D (10 µg/mL) por 10 min y después tratados con TCDD (10 nM) a los tiempos indicados. Posterior al tratamiento, se obtuvieron extractos proteicos y se capturaron las proteínas ubiquitinadas mediante el uso de TUBEs. Los niveles de RelA/p65 se determinaron por western blot. El DMSO fue utilizado como control. Los niveles de proteína fueron normalizados con actina. Los resultados se expresan como el promedio de \pm D.E. de 3 experimentos independientes. (A). Se analizaron las fracciones Input, Flow Through y Bound (B). Se muestran blots representativos de 3 experimentos independientes.

6.4. La activación del Ahr disminuye los niveles de P-RelA/p65

Una vez que se determinó que la disminución de los niveles proteicos de RelA/p65 dependían de la ubiquitinación de la proteína y su consecuente degradación proteosomal, en un proceso relacionado a la actividad transcripcional del Ahr, se procedió a evaluar si la activación del receptor Ah afecta también los niveles proteicos de RelA/p65 activado (P-RelA/p65). Para ello, se pretrataron a los macrófagos peritoneales con TCDD (10 nM) por 4, 8 y 12 h para su posterior estimulación con LPS e IFN γ (1 μ g/mL y 20 ng, respectivamente) por 30 min. El tratamiento con TCDD disminuyó los niveles de P- RelA/p65 a partir de las 8 h en aproximadamente un 60% hasta prácticamente inhibir su expresión a las 12 h (Figura 12A). Así mismo, el pretratamiento con TCDD inhibió la localización nuclear de P- RelA/p65 debida a la activación con LPS e IFN γ (Figura 12B). Este efecto es dependiente del Ahr ya que al usar cultivos de macrófagos peritoneales de ratones *Ahr*-nulos el TCDD no disminuyó ni los niveles de P- RelA/p65 ni su localización nuclear provocada por el LPS e IFN γ (Figura 13).

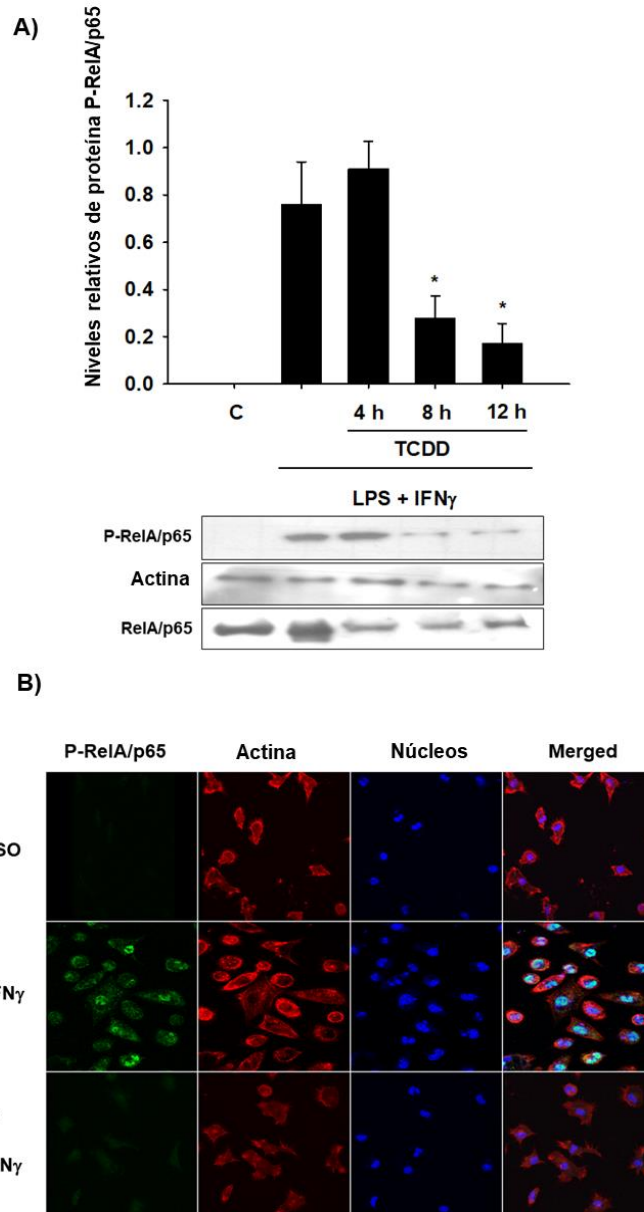


Figura 12. La activación del Ahr disminuye los niveles proteicos de P-RelA/p65. A) Macrófagos peritoneales de ratones silvestres fueron pretratados con TCDD (10 nM) durante 4, 8 y 12 h para posteriormente activarlos con LPS e IFN γ (1 μ g/mL y 20 ng, respectivamente) durante 30 min. Los niveles de P-RelA/p65 se determinaron por western blot. El tratamiento con LPS e IFN γ se usó como control. Los niveles de proteína fueron normalizados con actina. Se muestran blots representativos de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan como el promedio de \pm D.E. de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, tratamientos vs. control. B) Localización celular P-RelA/p65 en los macrófagos peritoneales. Después de los tratamientos con TCDD por 12 h y LPS e IFN γ por 30 min se obtuvieron imágenes de microscopía confocal. El DMSO fue utilizado como control. P-RelA/p65 se muestra en verde, los núcleos en azul y el citoesqueleto de actina en rojo.

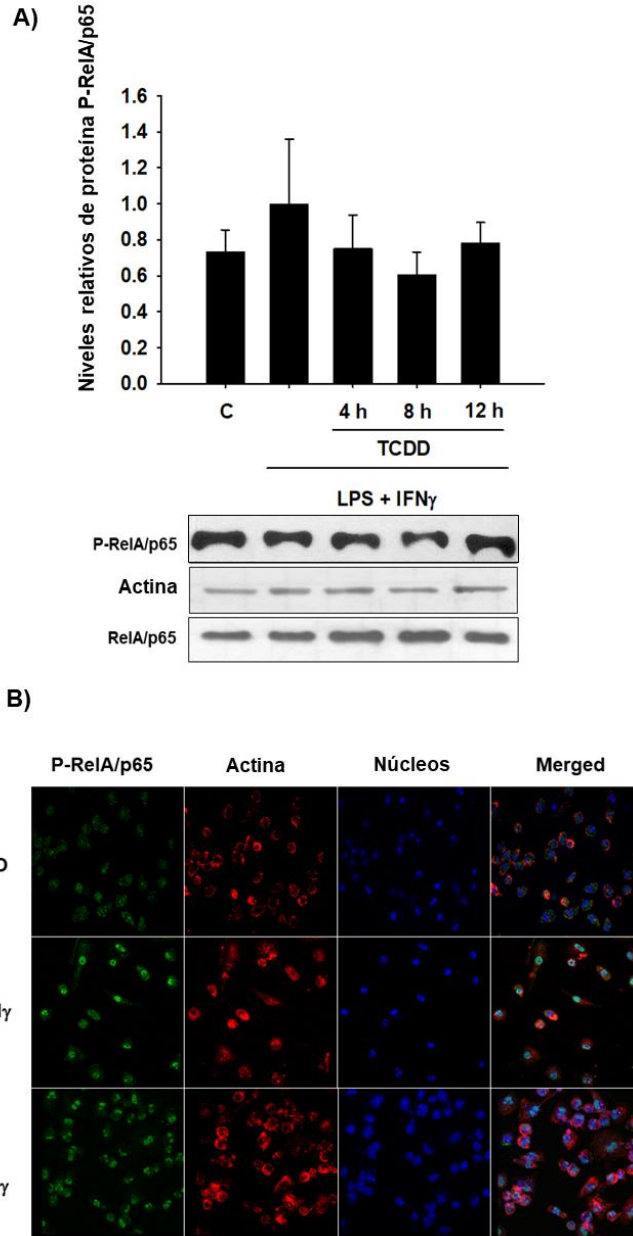


Figura 13. La disminución de los niveles proteicos de P-RelA/p65 provocada por el TCDD es dependiente del Ahr. A) Macrófagos peritoneales de ratones *Ahr*-nulos fueron pretratados con TCDD (10 nM) durante 4, 8 y 12 h para posteriormente activarlos con LPS e IFN γ (1 μ g/mL y 20 ng, respectivamente) durante 30 min. Los niveles de P-RelA/p65 se determinaron por western blot. El tratamiento con LPS e IFN γ se usó como control. Los niveles de proteína fueron normalizados con actina. Se muestran blots representativos de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan como el promedio de \pm D.E. de 3 experimentos independientes. B) Localización celular P-RelA/p65 en los macrófagos peritoneales. Después de los tratamientos con TCDD por 12 h y LPS e IFN γ por 30 min se obtuvieron imágenes de microscopía confocal. El DMSO fue utilizado como control. P-RelA/p65 se muestra en verde, los núcleos en azul y el citoesqueleto de actina en rojo.

6.5. El TCDD induce la formación de estructuras similares a vacuolas en macrófagos peritoneales

Los datos anteriores muestran que la activación del Ahr promueve la ubiquitinación y degradación proteosomal de RelA/p65 hasta transcurridas 12 h posteriores al tratamiento con TCDD. Sin embargo, se observa una disminución, independiente de la ubiquitinación, en los niveles proteicos de RelA/p65 a las 4 y 8 h de tratamiento. Por lo anterior, se exploró la participación de otros mecanismos degradativos que pudieran estar involucrados en la disminución de RelA/p65.

Para ello, macrófagos peritoneales de ratones silvestres fueron tratados con TCDD (10 nM) por 4 y 8 h y se analizó la morfología celular. Los tratamientos con TCDD a los tiempos indicados indujeron la formación de estructuras similares a vacuolas localizadas en el citoplasma de las células (Figura 14A). Doce h después de retirado el tratamiento mediante un lavado, se observó una disminución del número de vacuolas (Figura 14B), indicando que dicho efecto es reversible. Con el objetivo de determinar si la disminución observada en los niveles proteicos de RelA/p65 estaba mediada por una degradación dependiente de la vía lisosomal, cultivos de macrófagos peritoneales fueron co-tratados con cloroquina (CQ, 10 μ M), un inhibidor lisosomal, y con TCDD por 4 y 8 h. Como se muestra en la figura 14C, no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína de RelA/p65, lo que indica que efectivamente la degradación de RelA/p65 esta mediada por la vía lisosomal a los tiempos indicados.

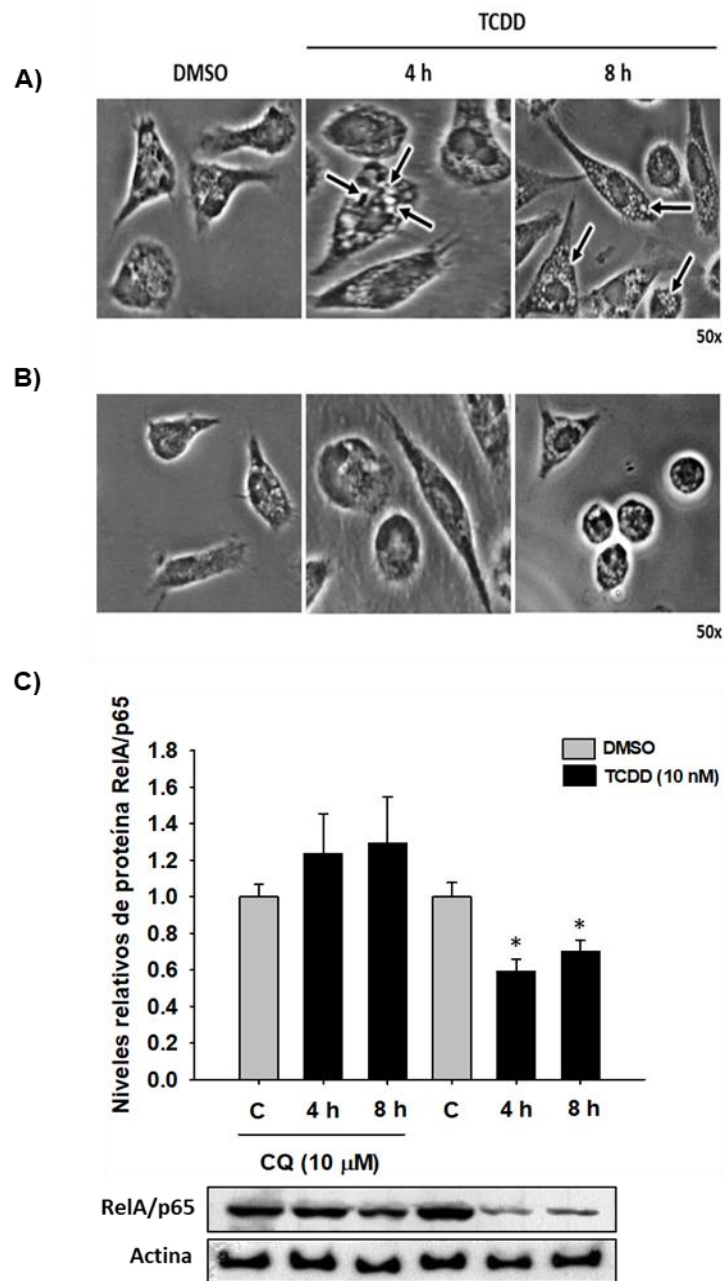


Figura 14. El TCDD induce la formación de estructuras similares a vacuolas en macrófagos peritoneales. A) Macrófagos peritoneales de ratón silvestre fueron tratados con TCDD (10 nM) durante 4 y 8 h. Se utilizó DMSO como control. Las estructuras vacuolares son señales por las flechas. B) Las células fueron lavadas con medio RPMI y se cultivaron por 12 h más en medio fresco. C) Macrófagos peritoneales fueron co-tratados con CQ (10 nM) y TCDD (10 nM) a los tiempos indicados. Los niveles de RelA/p65 se determinaron por western blot. El tratamiento con DMSO se usó como control. Los niveles de proteína fueron normalizados con actina. Se muestra un blot representativo de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan como el promedio de \pm D.E. de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, tratamientos vs. control.

6.6. La activación del Ahr induce la expresión de *commd1*

RelA/p65 es un factor de transcripción involucrado en múltiples procesos celulares y cuya degradación se encuentra determinada principalmente por el sistema ubiquitina-proteosoma. La ubiquitinación de RelA/p65 está controlada por varias ubiquitin E3 ligasas, incluidas el supresor de la señalización de citocinas (SOCS1), PDZ y LIM dominio 2 (PDLIM2) y el dominio COMM contenido en la proteína 1 (COMMD1) [68-70]. Dado que existe evidencia que señala al Ahr como un regulador de la degradación de proteínas a través de la inducción de distintas proteínas ubiquitinadoras, principalmente Ubch7 [19-21], se decidió examinar si el Ahr regula la expresión genética de *socs1* y/o *commd1*. A través de un análisis *in silico* de la región promotora del gen *socs1* (Figura 15) se encontraron 3 sitios putativos de unión al Ahr y 3 sitios de unión a RelA/p65. Para la región promotora del gen *commd1* se encontraron 3 sitios putativos de unión al Ahr y 2 sitios de unión a RelA/p65 (Figura 16).

-1598 GCCAGCCCAGCCTGTACCCACCTCAGACCAATAAGCCTGCCAAGTCCCAAGGGGATACTGTACCCCAAGAGGTTTTCTCACTTGGCTGGGCTGGAAGCACAGTTGGGGATGGAGTTACCAACCCC

1466 AGTACTACTAAAATAGGCTGGTACAAGGCCCTGTGTTAGTCCCCAGCACTGCAAAACAGCATCCGTGATGCTTGCAGACCAGAAAGACCTGAAGGCCAGTCTAGGCTGAGACGCGCTAGAGGGAGGCA

1336 GTGCTACAAACCAGCTTTATCGCCCAAGGGTACTGACCATGGCTGCACCACAACCAGCCACACAATTCAAGCACCACAAGATAAGTTGGTTGCTTAGGATGAAATATGGCGCTCTGTG
GATA-1 GATA-1

1074 CTCTGTCTGGGAGACCAGGACTTGGCCTCAGAGCTTCCAGAGGAGCCGCTGACAGCTAACAGAGAACTGTAGAGGGCAGTGTGCGTCACTGTGAGCACAGGGAAAGCTGCACGCGAACTCATCCGC
XRE

944 CTTCAATCATAAACATCGTCAGCCAGGCCACCTCCTGGCCTTTCAGGACAACTGAATCACGAAACCACACAGTGCCTAATGATAGTGTGACTGCCTGATCCTAAGCCAAGGTGTGCTCGGGGCCCT
AP-1

811 TGTACAGGCAGATGCTTGCTGGAGTTTGACAAAAGTTTGGGATTACAGCTTTTTTGGAAATCACAGCCCCCGGGGCTCAGTTTCTCCGGTCCCGACGTAGTAAGAGTGCAGAGAGTGTAGTCCAG
C/EBPgamma

679 GCCCCGGGAACCCAGCCCAACCCCGCCGTTTCCGAGGAAGTAGCCGGAGCGGGGCGCCCTCCCGACCGCTTAGGCTTCTTTGAAGCCTCTGCGTCCAGGCCACCGCTTGGGAAGCCCA
RelA RelA

548 AGCCAAGGCCAGCCGAATGGCCAACGGAGGGGCCGACGCGGCTCTGGAGGAGGGCGGGCCCAAGGCTCTTAGGACTAGTCCGGTTCCAAGAAGGGTCGAGATTGCCAAGGCCCTCG
XRE

420 GGTCTGGGCGAGGAAGACCTGGCAGGGAGGAGCTGCTTGGGAGCACAGGTCAGGCGAGGGGAGCCCTAACCAAGAATGCAGACACCCGGAGGGAGGAGGCGTGTCAGCCCCGCTAG
XRE

293 CATCCACACGGCGGGCTGCGATTTGGGGCGAGGTAGAGCAAAGAGCGGGCACCAAGTCTAAGCACCCAGGCACGGAACAAGATTCCGGTTGGAGCCGAACCCAGAGGTCCCAATGGGGA
C/EBPgamma

164 AGGTGCGGAGGCGAAACCAAGTTAGAGGAACCGTCTCCAGGGAGAGCCTCAGGAGTCTAGAGAGAACCCGAAAGACTTCCCGAAAGAGAAACCGAAAGCGGGGTGGGCTGGACCTGTGGGCGGGGC
RelA +1

37 CTGCTGGTTAAGAGCCTGATGCAGGGGCGGCGAGCAGCAGAGAGAAGTGCAGGCGTGGCAGCGGACGCTCCAGCCCCGAGCATGCGCGACAGCCGCCCCGAGCCCCAGCCCGGGCTCCCCG
CGTCTGCCCGAGGTGAGCCAAGGCAGCTGCGAGGGAGCAGGGGAGGGGATGGGAGGTGATGGGAGCAGAGCCCCGAGGACTAACCTCGCAGACTGTATGGCAGGTCGAGGATGCCACGCTT
CTGGCGCC

Figura 15. Análisis de la región promotora del gen *socs1*. La región promotora de *socs1* de ratón fue analizada *in silico* para identificar diversos elementos *cis*, entre ellos los sitios de unión para los factores de transcripción RelA/p65 (RelA), Ahr (Elementos de Respuesta a Xenobióticos o XREs), Proteína activadora 1 (AP-1), elemento de respuesta del factor hematopoyético GATA (GATA-1), Potenciador gamma de la proteína CAAT (C/EBPgamma). El sitio de inicio de la transcripción está marcado con +1 (PROMO 3.0, v.8.3.).

```

-1015 ATGGCTGCCTCATAGGCA TTTTCA TCATCTGAAAACAGAC TTTGTACCCATTA TGTCATTTCC TATTC TTCCC TCCTTCAGTCC TTGACAAC TGGA TTTTGT TA
                                                                                                                                              
                c-Fos                  c-Jun                  RelA                  c-Jun

912 TGGATTTGCTTAA TTTAGCAGTAAA TAAGATGTC CAGTTGCTTTCA TGCTGGCTTCA TTCGTT TCACGCATT TTTTTC TTTTTC TTTTAA TTA TG TAG
                                                                                                                                  
    C/EBPgamma                  XRE

806 GCCTGTCTG TGCACA TGAGTACA TTGCTGGTGGAAAGC TTTCAA TTTCTGAGGTGGAGTTACAGGAGGTTGTAAGTCGCC TAAAGCGAGTGCTGGAAACT

707 GAAC TTGGTCCGCTACAGGAA TAGTATACA TTC TTAACCA TTGAA TC TGTC CAGCCC TCA TTTAGCACA TTTTAAAGG TTCACCTA TATTA TAG TATCA TG
                                                                                                                                              
                c-Fos

605 CTACACGCTTA TTA TAGCTGAA TA TAAGTAAGGG TTTT TTTGGG TAA TTA TG TAGA TAAGTA TTTAC TAA TGC GA TCCAC TTTAAGAA TGAAA A TAAG
                                                                                                                                  
    XRE                  GATA-1

504 GCTTTGAAAAA TAGTGGTTA TAGAAA TGGAGACCAGACTAC TGA TAA TGGCTAGAAAAGACAACGTACGGGTA TACACAAAAGGAA TTAATGCAAGCAAA
                                                                                                                                              
                C/EBPgamma

406 GAGATCATGTCCTCA TGAAGTAGCTACA TTTGG GGGGCGTGGGAAAAGATTA TAGAGCTTGAAC TGAGTAGTAGGCAC TGCTCA TTTAA TTGCAAGC
                                                                                                                                              
                XRE                  RelA

307 TG TAGAA TGAGATACAGCCA TCGAAGAA TTAAGGTGGCA TTC TTACGAGTTACAGTTAGG TATC TCCAGCCAGCGA TCGTTCC TTTGAGTGCCGCA TTTG

207 CACA TCGGAGTGAAGAAGGAAACAAAAACACAGTGACTCTAAAGGAAAC TGAGTGGATTTGGCTGTGG TGGAAGTAGTGGATGTTGTGGCAGAGC
                                                                                                                                              
                AP-1

110 AAACGAGAGAACTGTTTATATCGACTAGTGGAGGAACCCGGCATCGCGTCCGTGGC TGCC TTTGCCAGCTTTTATGGCCCTTC TCGGCCCCCGTAGCGG

+1
10 ACCGGAGCTCAGCCGCTGGGCGGCAGGCCCTCCTTAGCCA

```

Figura 16. Análisis de la región promotora del gen *commd1*. La región promotora de *commd1* de ratón fue analizada *in silico* para identificar diversos elementos *cis*, entre ellos los sitios de unión para los factores de transcripción RelA/p65 (RelA), Ahr (Elementos de Respuesta a Xenobióticos o XREs), Proteína activadora 1 (AP-1), elemento de respuesta del factor hematopoyético GATA (GATA-1), Potenciador gamma de la proteína CAAT (C/EBPgamma), c-fos y c-jun. El sitio de inicio de la transcripción está marcado con +1 (PROMO 3.0, v.8.3.).

Para determinar si la activación del Ahr tiene un efecto sobre los niveles de ARNm de *socs1* y *commd1*, se trataron cultivos de macrófagos peritoneales de ratón con TCDD (10 nM) por 8 h y posteriormente se realizó la evaluación de la expresión de ARNm mediante qPCR. No se encontró que la expresión de *socs1* estuviera regulada por la activación del Ahr (datos no presentados). En contraste, como se

observa en la figura 17A, el tratamiento con TCDD provocó un incremento de más de 230 veces en los niveles de ARNm de *commd1* respecto a su control. Este incremento superó en 2.5 veces la expresión del gen canónico del Ahr, el *cyp1a1* (Figura 17B). Este efecto es dependiente del Ahr ya que no se observó en las células de ratones *Ahr*-nulos. La inducción en los niveles del mensajero de *commd1* se vio reflejada en un aumento de los niveles de proteína (Figura 17C).

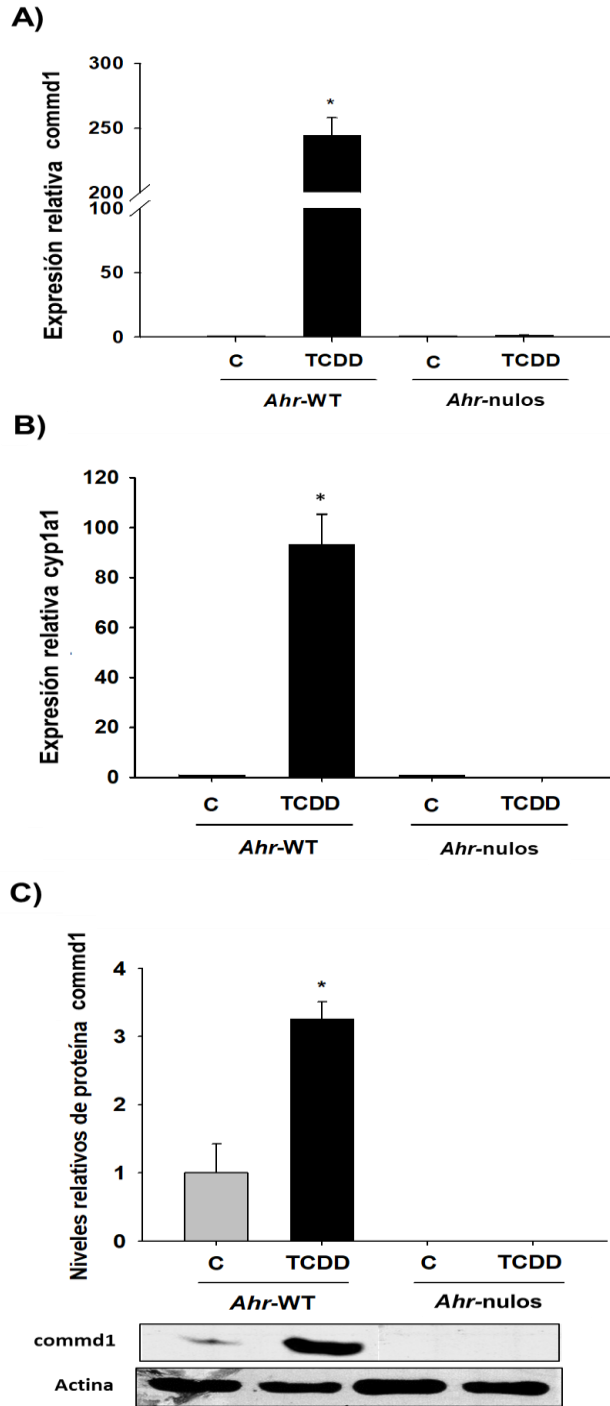


Figura 17. La activación del Ahr induce la expresión de commd1. Macrófagos peritoneales (1×10^6 células) de ratones WT y *Ahr*-nulos fueron tratados con TCDD (10 nM) por 8 h y se determinó la expresión del mensajero de commd1 (A) y *cyp1a1* (B). Los niveles proteicos de commd1 se determinaron por western blot (C). Se utilizó DMSO como control. Los resultados se expresan como el promedio de \pm D.E. de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, tratamientos vs. control.

7. DISCUSION

El Ahr participa en diferentes procesos celulares, entre ellos la homeostasis del Sistema Inmune, particularmente en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, a pesar de su importancia en dicho proceso, existe poca información con respecto a los mecanismos a través de los cuales el Ahr actúa como regulador negativo de la respuesta inmune.

En el presente trabajo, se demuestra que el Ahr participa en la regulación de la expresión de citocinas proinflamatorias a través de favorecer la degradación de NF- κ B por la vía lisosomal y proteosomal. Además, es capaz de inducir la expresión de commd1, una, proteína involucrada en la degradación de RelA/p65 a través del SUP [69, 71]. Esto último correlaciona con observaciones previas en las que se encontró que la activación del Ahr resulta en un incremento de diferentes proteínas ubiquitinadoras con la consecuente degradación de p53 y c-fos [19-21]. En su conjunto, estos estudios señalan al Ahr como un regulador de la degradación proteosomal a través de la inducción de genes que codifican para proteínas miembros del SUP.

Los tratamientos con TCDD y β NF provocaron una disminución de los niveles de proteína de TNF- α , IL-6 e IL-12. Dicha disminución es más evidente a las 12 h. Estos efectos podrían resultar en una pérdida de funciones del macrófago debido a que las citocinas cumplen un importante papel en el inicio de una respuesta inmune efectiva, además de crear un puente entre la inmunidad innata y adaptativa e influir en el microambiente de dichas células [72, 73]. El presente estudio es el primero en

demostrar que agonistas del Ahr disminuyen los niveles de citocinas inflamatorias en macrófagos peritoneales de ratón. Otros estudios reportan resultados similares. En una línea celular de ratón derivada de estroma, el TCDD es capaz de suprimir la expresión de IL-6 (Jensen *et al.*, 2003) y en un modelo de ratón *in vivo*, esta dioxina suprime los niveles de TNF- α , IL-12 e IFN γ [74]. En conjunto con nuestros datos, se refuerza la idea de que la activación del Ahr reduce los niveles de citocinas proinflamatorias.

Si bien la mayoría de los efectos del TCDD están mediados por el Ahr, no necesariamente es así [75, 76]. Por ello, se decidió comprobar si los efectos observados de esta dioxina sobre los niveles de las citosinas evaluadas dependen del receptor Ah. Para ello, se determinó el efecto de la β NF y el TCDD sobre los niveles de las citocinas proinflamatorias en macrófagos de ratones *Ahr*-nulos. A diferencia de los macrófagos silvestres, no se encontró una disminución de las citocinas por acción de los ligandos agonistas del Ahr. Además, se observó una exacerbada respuesta inflamatoria cuando se activaron a los macrófagos con LPS e IFN γ , en comparación con los macrófagos silvestres, representada por un incremento de 4 y 16 veces en los niveles de TNF- α e IL-6, respectivamente. De manera similar, Sekine y colaboradores (2009) observan que el 3-metilcolantreno, un agonista del Ahr, no modula la respuesta inflamatoria provocada por LPS en el plasma de ratones *Ahr*-nulos. Este grupo de investigación también observa que los niveles de TNF- α e IL-6 comparados con los de los ratones silvestres, se encuentran elevados a tal grado que provocaron un choque endotóxico lo que resulta en una disminución de la tasa de sobrevivencia [52].

Posterior a un estímulo de los receptores TLR4 con LPS e $IFN\gamma$, se induce la expresión de varias citocinas inflamatorias incluyendo al $TNF-\alpha$, IL-6 e IL-12 a través de 2 vías de señalización reguladas por los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B (RelA/p65) [77]. El Ahr puede interactúa con STAT1 lo que resulta en la inhibición de la transactivación del promotor del gen *IL-6* (Kimura et al., 2009). También existen estudios que demuestran la interacción del Ahr con NF- κ B, particularmente con RelB y RelA/p65. Vogel y colaboradores en el 2009 demostraron la formación de un heterodímero AhR-RelB el cual reconoce elementos de respuesta adyacentes para el Ahr y para NF- κ B. El resultado de dicha interacción es un incremento en los niveles de IL-8. Por otra parte, otros estudios demuestran la interacción del Ahr y RelA/p65 en macrófagos alveolares [78] y células Hepa1c1c7 [54]. La interacción del Ahr con otros factores de transcripción ya ha sido descrita. En particular, su interacción con el receptor para estrógenos alfa, el receptor para andrógenos y β catenina resulta en una degradación proteosomal de estos receptores [60] [59].

Considerando lo anterior, en el presente estudio se determinó si el Ahr modificaba los niveles proteicos de RelA/p65. Los resultados indican que, efectivamente, la activación del Ahr mediante el uso del TCDD provocó una disminución de entre un 30 y 40% en los niveles proteicos de RelA/p65 en macrófagos peritoneales. Este efecto es dependiente del proteosoma 26S y va acompañado de un incremento en los niveles de ubiquitinación. Estos resultados demuestran que la activación del Ahr promueve la ubiquitinación de RelA/p65 y su consecuente degradación vía proteosoma. Sin embargo, como se aprecia en la figura 10, se requieren de 12 h de tratamiento con TCDD para observar la

ubiquitinación de RelA/p65. Por otro lado, la inhibición de la transcripción bloqueó la ubiquitinación de RelA/p65 provocada por el TCDD. Estos resultados sugieren que se requiere de la expresión de uno o varios genes dependientes del Ahr para promover la ubiquitinación y degradación proteosomal de RelA/p65.

Recientemente, hemos reportado que el Ahr es capaz de promover la ubiquitinación y degradación de c-Fos, p53 y sinfilina-1 promoviendo la expresión de proteínas que participan en el SUP [19, 20]. Dado que se requieren de 12 h para observar la ubiquitinación de RelA/p65, hipotetizamos que durante ese lapso de tiempo se estaba llevando a cabo la expresión y síntesis de alguna proteína ubiquitinadora cuyo blanco es RelA/p65. El principal complejo ubiquitinador de RelA/p65 está constituido por las proteínas Elongina B y C, Cullin 2 y la enzima ubiquitin ligasa E3 socs1 [71]. También forma parte de éste complejo *commd1* que actúa como una proteína facilitadora de la interacción entre RelA/p65 y socs1, lo que permite la transferencia de la ubiquitina desde socs1 a su sustrato, en este caso, RelA/p65 [71]. Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, en los que se compararon los niveles de expresión de ARNm entre el bazo de ratones silvestres y el de ratones *Ahr*-nulos [19], muestran que en estos últimos hay niveles reducidos de *commd1* en comparación con el tejido proveniente del ratón silvestre. Estos datos sugieren que la expresión del gen *commd1* podría estar bajo el control del Ahr. Esta información nos llevó a investigar si la expresión de *commd1* se encuentra bajo el control del Ahr. A través de un análisis *in silico*, se identificaron 3 elementos putativos de respuesta a xenobióticos (XREs) en la región promotora del gen de *commd1* situados a -417, -660 y -890 pb en relación al sitio de inicio de la

transcripción sugiriendo la posible interacción del Ahr con el promotor del gen *commd1*. El tratamiento de macrófagos peritoneales de ratón con TCDD resultó en una inducción, de manera dependiente al Ahr, de hasta 250 veces en los niveles de ARNm de *commd1* en comparación con su control. La inducción en los niveles del transcrito también resultó en un incremento en los niveles proteicos. Estos resultados permiten proponer que el Ahr se une al promotor del gen *commd1* provocando su transactivación e incremento en sus niveles proteicos, favoreciendo la ubiquitinación y degradación de RelA/p65.

La degradación de RelA/p65 provocada por el tratamiento con TCDD se observó en macrófagos peritoneales sin ser activados con LPS e $INF\gamma$, indicando que esta se da en el citoplasma. Aunque el complejo *commd1*-*socs1* se ha observado en el núcleo [71], tanto *socs1* como *commd1* están predominantemente localizados en el citoplasma [79] [80, 81], lo que permite sugerir que la degradación de RelA/p65 también ocurre en este compartimento celular. De hecho, existen reportes que muestran que, además de en el núcleo, RelA/p65 también se degrada a través de la vía proteosomal en el citoplasma [67, 70, 82].

La activación de NF- κ B se da a través de su fosforilación en la serina 536 [83, 84]. Esta modificación permite que se internalice al núcleo y promueva la expresión de varios de sus genes blanco. En el presente trabajo, se reporta que el tratamiento con TCDD bloquea la activación de los macrófagos inducida con LPS e $INF\gamma$, lo cual disminuye, de manera dependiente al Ahr, los niveles proteicos de P-RelA/p65. Éste efecto también se aprecia en las imágenes de microscopía confocal donde la señal de P-RelA/p65 no se detecta en las células tratadas con el

ligando del receptor Ah. El efecto del TCDD sobre los niveles de P-RelA/p65 muy probablemente es una consecuencia de la disminución en los niveles de RelA/p65.

De manera interesante, en las imágenes de microscopía confocal, se observa la presencia de P-RelA/p65 en macrófagos no activados de ratones *Ahr*-nulos. Esta observación es consistente con lo reportado previamente por nuestro grupo [25] en el que los macrófagos peritoneales del ratón *Ahr*-nulo no activados presentan niveles elevados de citocinas inflamatorias comparado con las células WT. Los datos anteriores sugieren que la ausencia del Ahr promueve la fosforilación de RelA/p65. Los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo este fenómeno, se desconocen. Sin embargo, existen datos en la literatura que podrían explicarlo. XAP-2, además de ser una proteína chaperona del Ahr, cuando se encuentra separada de este, incrementa la formación del complejo CARMA1-BCL10-MALT1, lo que resulta en la activación de NF- κ B [85]. Considerando lo anterior, la ausencia del Ahr podría traducirse en un incremento en los niveles libres de XAP-2 estimulando la activación de RelA/p65. Otra posibilidad es que el Ahr, a través de su interacción con IKK α [86], bloquee la señalización de NF- κ B. Es decir, en los macrófagos *Ahr*-nulos dicho bloqueo no se llevaría a cabo.

Dado que no se encontró que el tratamiento con TCDD a las 4 y 8 h provocará la ubiquitinación de RelA/p65, y sin embargo si su degradación, se evaluó si esta se daba por la vía lisosomal. El tratamiento con el agonista del receptor Ah provocó la formación de estructuras membranales en el citoplasma de los macrófagos similares a lisosomas. Aunado a lo anterior, el tratamiento con cloroquina, un inhibidor lisosomal, bloqueó los efectos degradativos provocados por el TCDD a las 4 y 8 h.

Los datos anteriores indican que el TCDD también provoca la degradación de RelA/p65 a través de la vía lisosomal. Se ha reportado que el TCDD causa efectos como un aumento en la producción de ROS y la peroxidación de lípidos [87], siendo estos dos procesos importantes en la formación de vacuolas y la regulación de la actividad lisosomal que media procesos de autofagia en las células [88, 89], por lo que podría ser la producción de ROS la que promueve la degradación lisosomal.

No existen reportes que sugieran que el TCDD induzca la autofagia en macrófagos peritoneales de ratón, por lo que este sería el primer reporte. Sin embargo, se requieren de más experimentos para identificar la relación entre el Ahr y la degradación de proteínas por la vía lisosomal. Cabe mencionar que, si bien el MG132 inhibe la degradación de proteínas por la vía proteosomal, también tiene efectos de inhibición sobre la actividad de lisosomas [90-92], lo cual explica su efecto de estabilización sobre RelA/p65 a las 4 y 8 h de tratamiento con TCDD.

Tomando en consideración todos los resultados originados en el presente estudio, podemos proponer que el Ahr regula negativamente a RelA/p65 a través de dos mecanismos: i) mediante la promoción de su ubiquitinación y degradación proteosomal, probablemente, a través de la inducción de la expresión genética de *commd1* y ii) a través de la vía lisosomal (Figura 18).

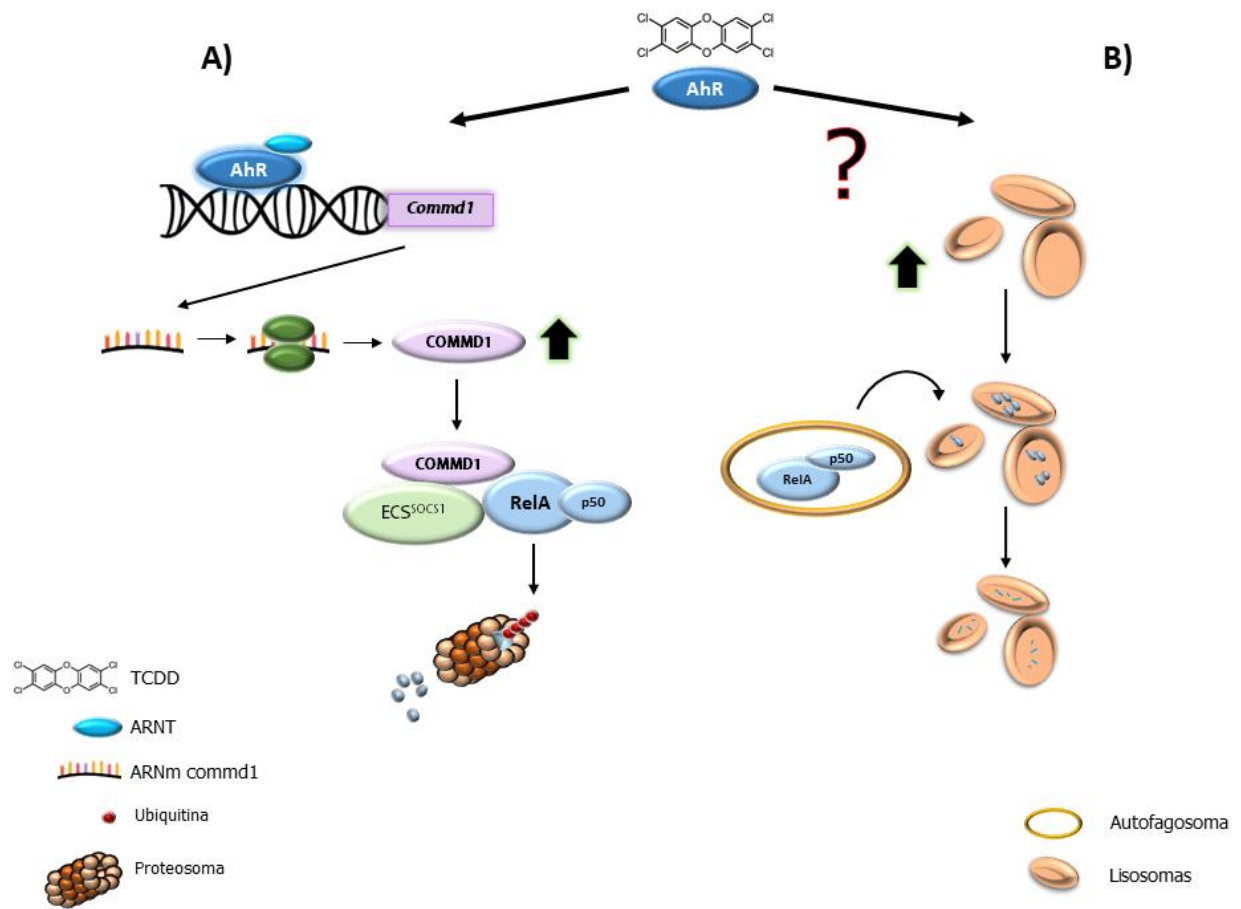


Figura 18. El AhR induce la degradación proteica de RelA/p65 a través del SUP y la vía lisosomal. A) La activación del AhR promueve su unión a los XRE's situados en el promotor del gen *commd1*, provocando la inducción de la expresión de *commd1* lo que resulta en un aumento de la ubiquitinación y la degradación de RelA/p65 por el proteosoma 26S. B) El TCDD induce la formación de estructuras similares a vacuolas que degradan a la proteína por la vía lisosomal.

8. CONCLUSIONES

1. La disminución de los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-12 provocada por los tratamientos con β NF y TCDD es dependiente del Ahr.
2. La activación del Ahr disminuye los niveles proteicos de RelA/p65 total y activado.
3. La activación del Ahr resulta en la ubiquitinación y degradación proteosomal de RelA/p65.
4. La ubiquitinación y degradación de RelA/p65 es dependiente de la actividad transcripcional.
5. El TCDD induce la formación de vacuolas y la degradación vía lisosomal de RelA/p65.
6. La activación del Ahr induce la expresión de commd1.

9. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se suma evidencia que señala la importancia de realizar más estudios con el fin de profundizar en el mecanismo e interacciones moleculares en los cuales el Ahr participa en la regulación del Sistema Inmune.

En particular, se proponen las siguientes perspectivas:

1. Determinar si la interacción Ahr-RelA/p65 ocurre en el citoplasma y/o núcleo de los macrófagos peritoneales de ratón.
2. Identificar si el Ahr forma parte del complejo ubiquitinador de RelA/p65.
3. Caracterizar molecularmente la regulación ejercida del Ahr sobre la expresión del gen *commd1*.
4. Evaluar si la ubiquitinación de RelA/p65 es dependiente de *commd1*.
5. Evaluar si la formación de vacuolas, inducida por el TCDD, es dependiente del Ahr y caracterizar molecularmente dicho proceso.
6. Evaluar el efecto de la activación del receptor Ah sobre el proceso de fagocitosis en macrófagos peritoneales de ratón.
7. Evaluar la utilización de ligandos endógenos del receptor Ahr para mediar el proceso inflamatorio inducido en ratones infectados con parásitos o sometidos a un proceso de trasplante.

10. REFERENCIAS

1. Denison, M.S. and S.R. Nagy, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. **43**: p. 309-34.
2. Puga, A., C. Ma, and J.L. Marlowe, *The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways*. *Biochem Pharmacol*, 2009. **77**(4): p. 713-22.
3. Mimura, J. and Y. Fujii-Kuriyama, *Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1619**(3): p. 263-8.
4. Ma, Q. and J.P. Whitlock, Jr., *A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(14): p. 8878-84.
5. Meyer, R., et al., *Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor kappa B: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor alpha*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(3): p. 966-70.
6. Vega, L. and G. Elizondo, *Aryl hydrocarbon receptor as a new therapeutic target for cancer and immune disorders*. *World J Pharmacol*, 2013. **2**(4): p. 107-114.
7. Hahn, M.E., *Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution*. *Chem Biol Interact*, 2002. **141**(1-2): p. 131-60.
8. Hahn, M.E., et al., *Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 13743-8.
9. Fernandez-Salguero, P., et al., *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor*. *Science*, 1995. **268**(5211): p. 722-6.
10. Abel, J. and T. Haarmann-Stemmann, *An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology*. *Biol Chem*, 2010. **391**(11): p. 1235-48.
11. Yin, J., et al., *Role of AhR in positive regulation of cell proliferation and survival*. *Cell Prolif*. **49**(5): p. 554-60.
12. Bekki, K., et al., *The aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates resistance to apoptosis induced in breast cancer cells*. *Pestic Biochem Physiol*, 2015. **120**: p. 5-13.

13. Tanos, R., et al., *Role of the Ah receptor in homeostatic control of fatty acid synthesis in the liver*. Toxicol Sci, 2012. **129**(2): p. 372-9.
14. Jaeger, C., et al., *Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice are protected from high fat diet-induced changes in metabolic rhythms*. Chronobiol Int, 2017. **34**(3): p. 318-336.
15. Bock, K.W. and C. Kohle, *Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(4): p. 393-404.
16. Barouki, R., X. Coumoul, and P.M. Fernandez-Salguero, *The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein*. FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3608-15.
17. Kawajiri, K. and Y. Fujii-Kuriyama, *Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor*. Arch Biochem Biophys, 2007. **464**(2): p. 207-12.
18. Esser, C., *The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 597-607.
19. Reyes-Hernandez, O.D., et al., *Ube2l3 gene expression is modulated by activation of the aryl hydrocarbon receptor: implications for p53 ubiquitination*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(6): p. 932-40.
20. Mejia-Garcia, A., et al., *Activation of AHR mediates the ubiquitination and proteasome degradation of c-Fos through the induction of Ubc4 gene expression*. Toxicology, 2015. **337**: p. 47-57.
21. Gonzalez-Barbosa, E., et al., *TCDD induces Ubch7 expression and synphilin-1 protein degradation in the mouse ventral midbrain*. J Biochem Mol Toxicol, 2017. **31**(10).
22. Elizondo, G., et al., *Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(5): p. 1056-63.
23. Stevens, E.A., J.D. Mezrich, and C.A. Bradfield, *The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system*. Immunology, 2009. **127**(3): p. 299-311.
24. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Over-production of IFN-gamma and IL-12 in AhR-null mice*. FEBS Lett, 2005. **579**(28): p. 6403-10.

25. Climaco-Arvizu, S., et al., *Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization*. Life Sci, 2016. **155**: p. 76-84.
26. Arango Duque, G. and A. Descoteaux, *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 491.
27. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 3-9.
28. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-151.
29. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49-62.
30. Gilmore, T.D. and M. Herscovitch, *Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6887-99.
31. Glezer, *The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanism of action of psychoactive drugs*. Rev Bras Psiquiatr, 2000. **22**: p. 26-30.
32. Brownell, E., et al., *Comparative genetic mapping of cellular rel sequences in man, mouse, and the domestic cat*. Am J Hum Genet, 1986. **39**(2): p. 194-202.
33. Deloukas, P., et al., *The human NFKB3 gene encoding the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B is located on chromosome 11q12*. Genomics, 1994. **19**(3): p. 592-4.
34. Neri, A., et al., *B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1075-87.
35. Ruben, S.M., et al., *Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B*. Science, 1991. **251**(5000): p. 1490-3.
36. Fujita, T., et al., *Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B*. Genes Dev, 1992. **6**(5): p. 775-87.
37. Kieran, M., et al., *The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product*. Cell, 1990. **62**(5): p. 1007-18.

38. Urban, M.B. and P.A. Baeuerle, *The 65-kD subunit of NF-kappa B is a receptor for I kappa B and a modulator of DNA-binding specificity*. Genes Dev, 1990. **4**(11): p. 1975-84.
39. Nolan, G.P., et al., *DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide*. Cell, 1991. **64**(5): p. 961-9.
40. Nishikori, M., *Classical and Alternative NF-kB Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies*. J.Clin.Exp.Hematopathol, 2005. **Vol.45**(No.1).
41. Lawrence, T., *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a001651.
42. Kerkvliet, N.I., *AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 746-60.
43. Head, J.L. and B.P. Lawrence, *The aryl hydrocarbon receptor is a modulator of anti-viral immunity*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 642-53.
44. Holsapple, M.P., et al., *A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update*. Toxicology, 1991. **69**(3): p. 219-55.
45. Kerkvliet, N.I., *Recent advances in understanding the mechanisms of TCDD immunotoxicity*. Int Immunopharmacol, 2002. **2**(2-3): p. 277-91.
46. Schmidt, J.V., et al., *Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6731-6.
47. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice*. Vet Pathol, 1997. **34**(6): p. 605-14.
48. Quintana, F.J., et al., *Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 65-71.
49. Prell, R.A. and N.I. Kerkvliet, *Involvement of altered B7 expression in dioxin immunotoxicity: B7 transfection restores the CTL but not the autoantibody response to the P815 mastocytoma*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2695-703.
50. Teske, S., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor increases pulmonary neutrophilia and diminishes host resistance to influenza A virus*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(1): p. L111-24.

51. Kimura, A., et al., *Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 2027-35.
52. Sekine, H., et al., *Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(24): p. 6391-400.
53. Thatcher, T.H., et al., *Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice develop heightened inflammatory responses to cigarette smoke and endotoxin associated with rapid loss of the nuclear factor-kappaB component RelB*. Am J Pathol, 2007. **170**(3): p. 855-64.
54. Tian, Y., et al., *Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 510-5.
55. Vogel, C.F., et al., *RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(12): p. 2941-55.
56. Shi, L.Z., et al., *The aryl hydrocarbon receptor is required for optimal resistance to Listeria monocytogenes infection in mice*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6952-62.
57. Elizondo, G., et al., *Deletion of the aryl hydrocarbon receptor enhances the inflammatory response to Leishmania major infection*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(9): p. 1220-9.
58. Sanchez, Y., et al., *The unexpected role for the aryl hydrocarbon receptor on susceptibility to experimental toxoplasmosis*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 505694.
59. Kawajiri, K., et al., *Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13481-6.
60. Ohtake, F., Y. Fujii-Kuriyama, and S. Kato, *AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 474-84.
61. Aillet, F., et al., *Isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities*. Methods Mol Biol, 2012. **832**: p. 173-83.
62. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
63. Gibson, U.E., C.A. Heid, and P.M. Williams, *A novel method for real time quantitative RT-PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 995-1001.

64. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
65. Viatour, P., et al., *Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(1): p. 43-52.
66. Ruby, C.E., M. Leid, and N.I. Kerkvliet, *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses tumor necrosis factor-alpha and anti-CD40-induced activation of NF-kappaB/Rel in dendritic cells: p50 homodimer activation is not affected*. *Mol Pharmacol*, 2002. **62**(3): p. 722-8.
67. Hou, Y., F. Moreau, and K. Chadee, *PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NFkappaB/p65*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 1300.
68. Ryo, A., et al., *Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA*. *Mol Cell*, 2003. **12**(6): p. 1413-26.
69. Maine, G.N. and E. Burstein, *COMMD proteins: COMMing to the scene*. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(15): p. 1997-2005.
70. Tanaka, T., M.J. Grusby, and T. Kaisho, *PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(6): p. 584-91.
71. Maine, G.N., et al., *COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase*. *EMBO J*, 2007. **26**(2): p. 436-47.
72. Unanue, E.R., et al., *Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages*. *Am J Pathol*, 1976. **85**(2): p. 465-78.
73. Huynh, K.K., et al., *Fusion, fission, and secretion during phagocytosis*. *Physiology (Bethesda)*, 2007. **22**: p. 366-72.
74. Warren, T.K., K.A. Mitchell, and B.P. Lawrence, *Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppresses the humoral and cell-mediated immune responses to influenza A virus without affecting cytolytic activity in the lung*. *Toxicological Sciences*, 2000. **56**(1): p. 114-123.
75. Hossain, A., et al., *The Ah receptor is not involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin-mediated apoptosis in human leukemic T cell lines*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(31): p. 19853-8.

76. Ahmed, S., et al., *Protein kinase C θ activity is involved in the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced signal transduction pathway leading to apoptosis in L-MAT, a human lymphoblastic T-cell line.* FEBS J, 2005. **272**(4): p. 903-15.
77. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
78. Chen, P.H., et al., *Aryl hydrocarbon receptor in association with RelA modulates IL-6 expression in non-smoking lung cancer.* Oncogene, 2012. **31**(20): p. 2555-65.
79. de Bie, P., et al., *Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF-kappaB signalling.* Biochem J, 2006. **398**(1): p. 63-71.
80. Burstein, E., et al., *COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1.* J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 22222-32.
81. Klomp, A.E., et al., *The ubiquitously expressed MURR1 protein is absent in canine copper toxicosis.* J Hepatol, 2003. **39**(5): p. 703-9.
82. Ganesh, L., et al., *The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes.* Nature, 2003. **426**(6968): p. 853-7.
83. Sakurai, H., et al., *IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain.* J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30353-6.
84. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB.* Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
85. Schimmack, G., et al., *AIP augments CARMA1-BCL10-MALT1 complex formation to facilitate NF-kappaB signaling upon T cell activation.* Cell Commun Signal, 2014. **12**: p. 49.
86. Kurita, H., et al., *The Ah receptor recruits IKKalpha to its target binding motifs to phosphorylate serine-10 in histone H3 required for transcriptional activation.* Toxicol Sci, 2014. **139**(1): p. 121-32.
87. Forgacs, A.L., et al., *Effects of TCDD on the expression of nuclear encoded mitochondrial genes.* Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **246**(1-2): p. 58-65.
88. Zhang, X., et al., *MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy.* Nat Commun, 2016. **7**: p. 12109.

89. Jaishy, B. and E.D. Abel, *Lipids, lysosomes, and autophagy*. J Lipid Res, 2016. **57**(9): p. 1619-35.
90. Lee, D.H. and A.L. Goldberg, *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(10): p. 397-403.
91. Rock, K.L., et al., *Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules*. Cell, 1994. **78**(5): p. 761-71.
92. Mailhes, J.B., et al., *MG-132, an inhibitor of proteasomes and calpains, induced inhibition of oocyte maturation and aneuploidy in mouse oocytes*. Cell Chromosome, 2002. **1**(1): p. 2.

11. APENDICE I

Artículo publicado

Biochemical Pharmacology 155 (2018) 141–149



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



Activation of aryl hydrocarbon receptor regulates the LPS/IFN γ -induced inflammatory response by inducing ubiquitin-proteosomal and lysosomal degradation of RelA/p65

O. Domínguez-Acosta^a, L. Vega^b, E. Estrada-Muñoz^b, M.S. Rodríguez^c, F.J. Gonzalez^d, G. Elizondo^{a,*}

^aDepartamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, Zacatenco, México D. F., Av. IPN 2508, C.P. 07360, Mexico

^bDepartamento de Toxicología, CINVESTAV-IPN, Zacatenco, México D. F., Av. IPN 2508, C.P. 07360, Mexico

^cInstitut des Technologies Avancées en Sciences du Vivant (ITAV) CNRS-LSR3505, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) CNRS UMR8601, Université de Toulouse, 31106 Toulouse, France

^dLaboratory of Metabolism, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

ARTICLE INFO

Keywords

Aryl hydrocarbon receptor

Macrophage

Ubiquitination

RelA/p65 inflammatory cytokines

ABSTRACT

Several studies have identified the aryl hydrocarbon receptor (AhR) as a negative regulator of the innate and adaptive immune responses. However, the molecular mechanisms by which this transcription factor exerts such modulatory effects are not well understood. Interaction between AhR and RelA/p65 has previously been reported. RelA/p65 is the major NF κ B subunit that plays a critical role in immune responses to infection. The aim of the present study was to determine whether the activation of AhR disrupted RelA/p65 signaling in mouse peritoneal macrophages by decreasing its half-life. The data demonstrate that the activation of AhR by TCDD and β -naphthoflavone (β -NF) decreased protein levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-12 after macrophage activation with LPS/IFN γ . In an AhR dependent manner, TCDD treatment induces RelA/p65 ubiquitination and proteosomal degradation, an effect dependent on AhR transcriptional activity. Activation of AhR also induced lysosome-like membrane structure formation in mouse peritoneal macrophages and RelA/p65 lysosome-dependent degradation. In conclusion, these results demonstrate that AhR activation promotes RelA/p65 protein degradation through the ubiquitin proteasome system, as well as through the lysosomes, resulting in decreased pro-inflammatory cytokine levels in mouse peritoneal macrophages.

1. Introduction

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor and a member of the bHLH-PAS (basic-helix-loop-helix, Per-Arnt-Sim) superfamily. Upon binding to its ligands, AhR translocates from the cytoplasm to the nucleus where it binds to xenobiotic response elements (XREs) located in the promoter of its target genes, such as cytochrome P450s (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), NAD(P)H quinone oxidoreductase, and UDP-glucuronosyl-transferase 6 [1]. In addition to its role in xenobiotic metabolism, AhR has been implicated in several cellular processes, including liver development [2], neurogenesis [3], cholesterol and glucose metabolism [4,5], cell proliferation and apoptosis [6], and in the homeostasis of the immune system [7–9]. It was shown that AhR modulates the adaptive and innate immune responses and has been implicated in the differentiation of IL-17-producing helper T cells and Treg cells [10]. AhR might act as a negative

regulator of the immune system according to several studies. *Ahr*-null mouse lymphocytes produce more IFN γ and IL-12 compared to wild-type (WT) lymphocytes [11]. Moreover, after IFN γ and LPS activation, *Ahr*-null mouse macrophages produce higher levels of IL-1 β , IL-6, IL-12, and TNF- α than do WT macrophages [12,13]. The latter might explain why *Ahr*-null mice are more susceptible to endotoxin shock induced by LPS [12] and exhibit an exacerbated immune response against *Leishmania major* and *Toxoplasma gondii* infections [14,15]. However, the molecular mechanisms by which AhR modulates macrophage pro-inflammatory cytokine levels are not well understood.

Rapid activation of an acute inflammatory response in macrophages is essential for innate immunity and host defense. Acute macrophage activation is mediated by receptors that sense microbial products and activate inflammatory signaling pathways such as Toll-like receptors (TLRs) [16]. In particular, TLR4 activation leads to the production of cytokines and other inflammatory mediators, including IL-1, IL-6, TNF-

* Corresponding author.

E-mail address: guzman@cinvestav.mx (G. Elizondo).

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.016>

Received 21 May 2018; Accepted 19 June 2018

Available online 21 June 2018

0006-2952/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

α , IL-12 and IFNs [17]. TLR4 signaling occurs via the activation of nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), in particular RelA/p65 [18], which is typically involved in the inflammatory response. It was shown that *Ahr*-null alveolar cells present increased NF- κ B activity compared to WT cells [19]. Moreover, interaction between NF- κ B and AhR was observed. In particular, the NF- κ B subunit RelB was found to be physically associated with AhR in U937 macrophage [20], while Tian and collaborators demonstrated a physical association between AhR and RelA/p65 in Hepa1c1c7 cells treated with TCDD [21].

The above information suggests a crosstalk between NF- κ B and AhR pathways that may explain the negative modulation exerted by the AhR on the levels of inflammatory cytokines. On the other hand, we have shown that AhR activation decrease p53 and c-Fos levels by inducing their ubiquitination and proteosomal degradation [22,23]. The foregoing leads us to propose that the AhR promote the degradation of RelA/p65 in a similar way as it does with p53 and c-Fos.

Therefore, the goal of the present study was to evaluate whether the activation of AhR disrupted RelA/p65 signaling by decreasing the RelA/p65 protein levels and/or nuclear internalization in mouse macrophages.

2. Material and methods

2.1. Materials

Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Hyclone (Logan, UT, USA). RPMI-1640 media, L-glutamine, non-essential amino acids, antibiotics/antimycotics, and sodium pyruvate were purchased from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) was obtained from AccuStandard (New Haven, CT, USA). β -Naphthoflavone (β NF), lipopolysaccharides (LPS), MG132 (Z-Leu-Leu-al), actinomycin D (Act D), dimethyl sulfoxide (DMSO), chloroquine (CHL), cycloheximide (CHX) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and recombinant mouse IFN γ was obtained from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA).

2.2. Animals

The previously described *Ahr*-null mice [7] were genotyped by polymerase chain reaction (PCR). Briefly, genomic DNA was extracted from the tail tip using an extraction buffer containing 1.6 μ g of proteinase K, 1 M Tris-HCl, pH 8.5, 1 M NaCl, 0.5 M EDTA and 20% SDS. To generate a 450-bp fragment (corresponding to the WT) or a 1.5-kb fragment (corresponding to the *Ahr*-null), the following primers were used: forward: 5'-GGCTAGCGTGGGGTTTCTC-3' and reverse: 5'-CTA GAACGGCACTAGGTAGGTCAG-3'. The PCR reaction conditions were as follows: 3 min of denaturation at 94 °C, 30 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 2.5 min, followed by 72 °C for 10 min for the final extension. The resulting PCR products were subjected to electrophoresis in a 2% agarose gel containing ethidium bromide and visualized by UV trans-illumination. WT littermates were used as control mice. C57BL/6 mice were housed in a pathogen-free facility, fed with autoclaved Purina rodent chow (St. Louis, MO, USA), and provided with water ad libitum. All animal studies were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health and the Mexican Regulation of Animal Care and Maintenance (NOM-062-ZOO-1999, 2001).

2.3. Cell culture and stimulation

Resident macrophages were harvested from the peritoneal cavity of 10- to 13-week-old female mice. Briefly, 10 mL of ice-cold sterile PBS pH 7.4 was injected into the peritoneal cavity, and the area massaged

for 5 min. Cells were collected from five to six mice, pooled, and collected by centrifugation at 2000 rpm for 10 min at 4 °C and then washed twice. Cell viability was assessed by Trypan blue exclusion. Macrophages were adjusted to 1×10^6 cell/mL in RPMI-1640 media supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 0.5% non-essential amino acids, 0.5% sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. One milliliter of the cell suspension was transferred into a 12-well polystyrene tissue culture plate and incubated for 2 h at 37 °C in humidified air containing 5% CO $_2$. The suspended cells were washed twice with RPMI-1640 media, and the remaining adherent macrophages were replenished with supplemented RPMI-1640 media. Macrophages were activated by adding LPS and IFN γ (1 μ g/mL and 20 ng/mL, respectively, 30 min) and treated with β NF (1 μ M), TCDD (10 nM) or CHL (10 μ M) at the indicated times. DMSO was used as a vehicle (< 0.1%, v/v).

2.4. Cytokine quantification

After the macrophage stimulation and treatments, the supernatants were collected and secretion of TNF- α and IL-6 (OPTIA ELISA KIT BD, San Jose, CA, USA) and secretion of IL-12/IL-23 (p40) (ELISA MAX Deluxe sets, BioLegend, San Diego, CA, USA) were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), according to the manufacturer's instructions.

2.5. Western blotting

Cultured cells were lysed in 400 μ L of buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 10 mM NaF, 10 mM Na $_2$ VO $_4$, 20 mM glycerol phosphate and minicomplete protease inhibitor cocktail (1 tablet/10 mL, Roche, Mannheim, Germany). The protein concentrations were determined using the Bradford reaction (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Aliquots (50 μ g) were solubilized in sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 2% mercaptoethanol, and 0.001% bromophenol blue) and subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis at 100 V for 3 h. The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using a mini trans-blot device (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at a constant voltage of 100 V for 4 h in transfer buffer (48 mM Tris-HCl, 39 mM glycine, pH 8.3, 20% methanol). Following the transfer, the membranes were blocked overnight at 4 °C in the presence of 2% nonfat dry milk and 0.5% bovine serum albumin (BSA) in blocking buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) and subsequently incubated at 4 °C overnight with anti-RelA/p65 (1:500, Cat: sc-372, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or anti-phospho-RelA/p65 (Ser536) (1:4000, Cat: 3033, Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA) or anti-actin (1:1000, Cat: sc-1616, Zymed, San Francisco, CA, USA) antibodies diluted in buffer (25 mM Tris-HCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 0.05% nonfat dry milk, 0.05% BSA). After washing, the membranes were incubated with their corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies: HRP-goat anti-rabbit IgG (1:2000, Cat: 81-6120, Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA) or HRP-rabbit anti-goat IgG (1:2000, Cat: 31402, Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA) for 3 h at 4 °C. The membranes were washed in TBS, and the immunoreactive proteins were detected using an ECL Western blotting detection kit (Millipore, Billerica, MA, USA). The integrated optical density of the bands was quantified by densitometry using ImageJ Software.

2.6. RelA/p65 ubiquitination assay

The capture of ubiquitinated proteins from peritoneal macrophage cultures was performed using tandem ubiquitin binding entities (TUBEs), as previously described [24]. Briefly, cell extracts were obtained using 400 μ L of lysis buffer (50 mM sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 10 mM glycerol-2-phosphate, 0.2% Nonidet-P40,

2 mM EDTA, 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail Minicomplete [Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA] at pH 7.5) complemented with 100 µg of TUBES, previously obtained as described [25]. Subsequently, the lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C, and an aliquot of the supernatant corresponding to the input fraction was collected (50 µL). Next, 100 µL of glutathione agarose beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 5 µL of 0.1 M DTT were added and incubated with slow agitation at 4 °C overnight. The samples were centrifuged at 12,000 rpm for 5 min at 4 °C, and an aliquot corresponding to the flow through fraction was collected. Finally, the pellet obtained in the previous step, corresponding to the bound fraction, was washed 3 times with 1 mL of 0.05% Tween-20. The fractions were loaded onto an SDS-PAGE gel, and RelA/p65 was detected by Western blotting, as described in Section 2.5.

2.7. Confocal microscopy

Peritoneal macrophages (5×10^6) were seeded into 35-mm dishes with glass coverslips. After 24 h, the cells were treated with LPS/IFN γ (1 µg/mL and 20 ng/mL, respectively) for 30 min or were pre-treated with 10 nM TCDD for 12 h before LPS/IFN γ followed by fixation with 3.5% paraformaldehyde in PBS for 2 h at 4 °C. The fixed cells were permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS for 5 min and blocked for 1 h with 5% BSA at room temperature (RT). The cells were then incubated for 2 h with anti-phospho-RelA/p65 (Ser536) (1:50, Cat: 3033, Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA) in 5% BSA. The primary antibody was detected with FITC-labeled goat anti-rabbit antibodies (1:100, Cat: 65; 6111, Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA). F-actin was stained with rhodamine-phalloidin (Cat: R415, Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA) for 15 min at RT and then mounted with Vectashield mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Images were captured with a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.8. Statistical analysis

The results are presented as the mean values \pm the standard deviation (S.D.). The statistical significance of the data was evaluated using Student's *t*-test. In all cases, the differences between groups were considered to be statistically significant when the *p*-value was < 0.05 .

3. Results

Several research groups have demonstrated the involvement of AhR in cytokine expression in macrophages [12,13,26]. However, the nature of such regulation is not yet well understood. The goal of the present study was to determine the mechanism by which AhR modulates cytokine levels. The effect of AhR activation by treatment with β NF and TCDD on cytokine protein levels was determined in WT macrophages. Both AhR ligands decreased LPS/IFN γ -induced TNF- α , IL-6, IL-12 protein levels were only decreased by TCDD treatment (Fig. 1). In contrast, similar treatments failed to block the LPS/IFN γ -induced pro-inflammatory cytokines in *Ahr*-null macrophages (Fig. 2). These results, together with previous data, establish the negative action of AhR on pro-inflammatory cytokine levels [11,14,26]. TNF α , IL-6, and IL-12 gene expression is under p65/p50 regulation, also known as RelA/p65 [27], which is the most frequently activated form of NF- κ B in TLR signaling. Therefore, the effect of TCDD on RelA/p65 protein levels was evaluated. Peritoneal macrophages treated with TCDD resulted in decreased RelA/p65 protein levels. This effect was observed after 4 h of treatment, and was maintained for 12 h (Fig. 3A). In contrast, TCDD failed to decrease RelA/p65 protein levels when *Ahr*-null peritoneal macrophages were used (Fig. 3B). TCDD induced RelA/p65 degradation, though it was incomplete, this is most likely because RelA/p65 present a dynamic protein turnover, with a half-life of around 6 h [28].

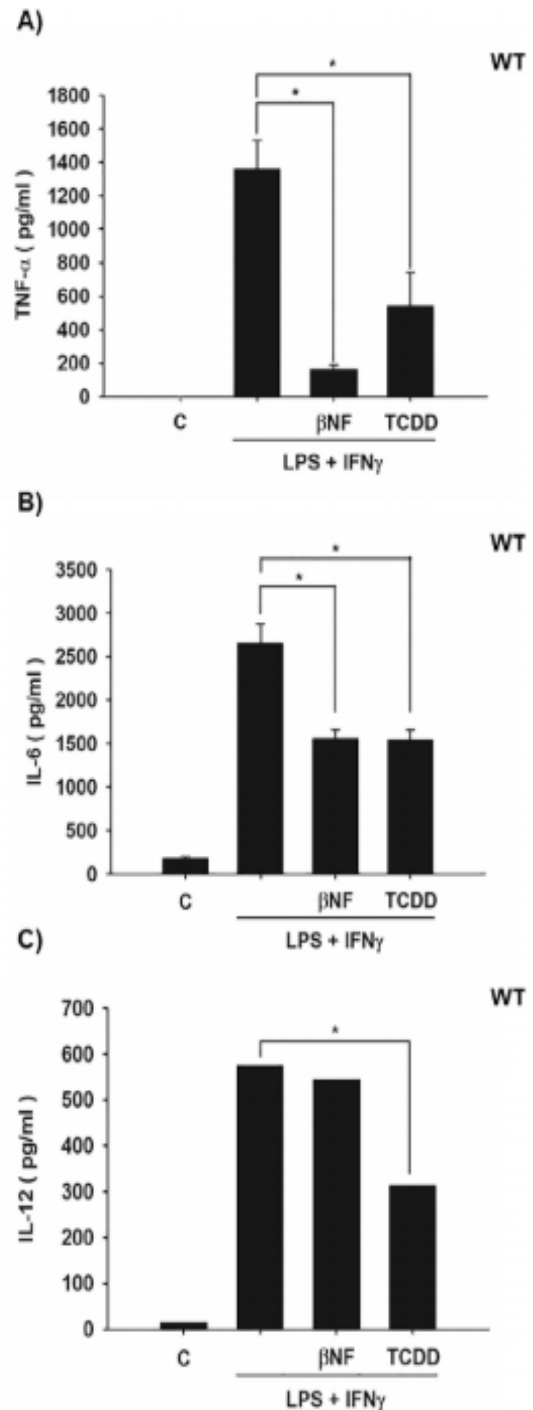


Fig. 1. Effect of β NF and TCDD on pro-inflammatory cytokine levels in WT mouse macrophages. Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from WT mice were activated with LPS and IFN γ together (1 µg/mL and 20 ng/mL, respectively) and treated with 1 µM β NF or 10 nM TCDD. After 12 h, TNF- α (A), IL-6 (B), and IL-12 (C) protein levels from supernatant cultures were determined by ELISA. DMSO was used as a control. The results are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$.

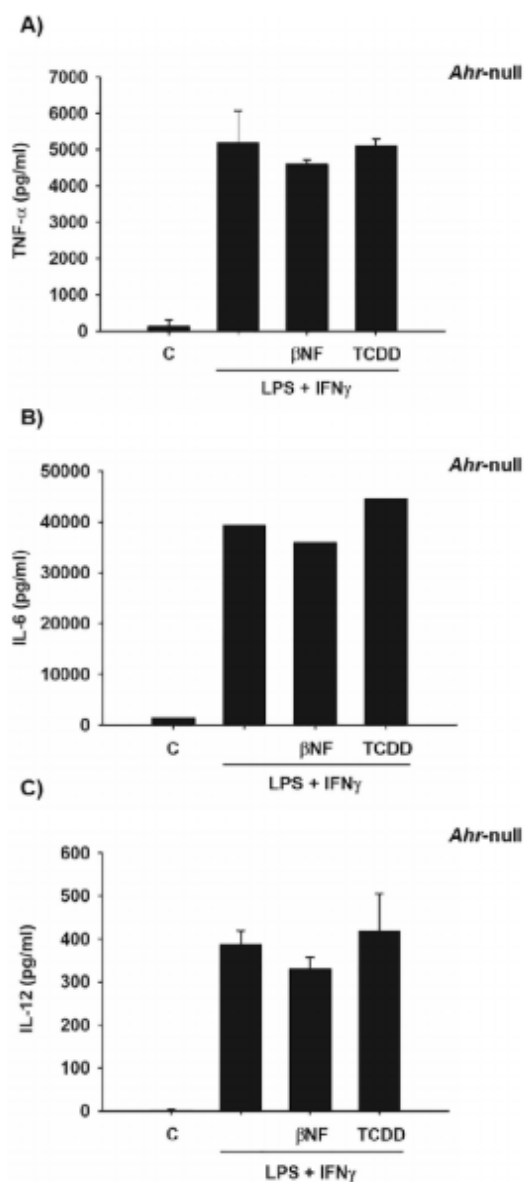


Fig. 2. Effect of β NF and TCDD on pro-inflammatory cytokine levels in *Ahr*-null mouse macrophages. Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from *Ahr*-null mice were activated with LPS and IFN γ together (1 μ g/mL and 20 ng/mL, respectively) and treated with 1 μ M β NF or 10 nM TCDD. After 12 h, TNF- α (A), IL-6 (B), and IL-12 (C) protein levels from supernatant cultures were determined by ELISA. DMSO was used as a control. The results are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

Therefore, we investigated whether the inhibition of *de novo* protein synthesis exacerbates RelA/p65 protein degradation after AhR activation. Peritoneal macrophages were treated with 10 nM TCDD for 4, 8, and 12 h, followed by cycloheximide treatment (10 μ g/mL) for 6 h

before RelA/p65 protein levels were determined. Treatment with TCDD significantly decreased RelA/p65 levels at 4 h. At the later time points, RelA/p65 signal was no longer detected (Fig. 3C). Approximately 80–90% of proteins undergo proteasome degradation [29]. Thus, the role of proteasome 26S on RelA/p65 degradation was evaluated. MG132, an inhibitor of the catalytic core of the proteasome, blocks the TCDD-dependent degradation of RelA/p65, suggesting that AhR activation promotes the degradation of this transcription factor by the 26S proteasome (Fig. 3D). Since the identification of proteins by the 26S proteasome requires prior ubiquitination, the effect of TCDD on the ubiquitination of RelA/p65 from WT and *Ahr*-null macrophages was determined. TCDD treatment for 12 h resulted in an increase in RelA/p65 ubiquitinated forms in macrophages from WT mice (Fig. 4A). In contrast, this effect was not observed when *Ahr*-null macrophages were treated with TCDD, indicating that TCDD-induced ubiquitination is also AhR dependent (Fig. 4B).

We previously found that AhR promotes p53 and *c-fos* ubiquitination and proteasome degradation through induction of the *Ubch7* gene, encoding an E2 ubiquitin conjugating enzyme [22,23]. Therefore, the role of AhR transcriptional activity on RelA/p65 ubiquitination was investigated. WT peritoneal macrophages were co-treated with actinomycin D (a transcription inhibitor) and TCDD, and RelA/p65 protein and ubiquitin levels were then determined. Under this treatment scheme, TCDD failed to promote RelA/p65 ubiquitination and degradation (Fig. 5A and B). These results suggest that AhR transcriptional activity is required for RelA/p65 ubiquitination.

Given that the activation of the AhR partially promotes the degradation of RelA/p65, it was determined whether this decrease is sufficient to affect the levels of active RelA/p65. For it, peritoneal macrophages from WT mice were treated with TCDD before activating the cells with LPS and IFN γ . The levels of phosphorylated RelA/p65 protein (P-RelA/p65) were determined by Western blotting. P-RelA/p65 protein levels were diminished by TCDD after 8 h and 12 h of treatment (Fig. 6A). Accordingly, confocal images confirmed the activation of RelA/p65 after LPS and IFN γ treatment as revealed by its nuclear internalization. Similar to the Western blot results, treatment with TCDD decreased the P-RelA/p65 signal (Fig. 6B). In contrast to these results, TCDD treatment failed to decrease the P-RelA/p65 levels when *Ahr*-null macrophages were used (Fig. 7), confirming the AhR dependence of this effect. Interestingly, the *Ahr*-null macrophages presented P-RelA/p65 signal in control conditions without stimulus, suggesting that the absence of AhR promotes RelA/p65 phosphorylation.

TCDD treatment promotes RelA/p65 degradation after 4 h (Fig. 3A). However, ubiquitination was observed only after 12 h, which suggests an alternative degradation pathway. Autophagy, an evolutionarily conserved lysosome-dependent system in eukaryotes, also plays a role in protein turnover. During autophagy, the targeted proteins are delivered into double-membrane autophagosomes for lysosomal degradation. Therefore, we investigated whether this degradation system was involved in the TCDD-dependent RelA/p65 protein degradation at the early time points. TCDD treatment at 4 h and 8 h induced the formation of lysosome-like membrane structures (Fig. 8A). Washing the cell cultures resulted in a decrease in the number of vacuoles, a property of autophagosomes [30] (Fig. 8B). Additionally, treatment with chloroquine, a lysosome inhibitor, blocked the RelA/p65 protein degradation induced by TCDD (Fig. 8C). Taken together, these results suggest that TCDD also induces lysosome-dependent RelA/p65 protein degradation.

4. Discussion

Macrophages play a significant role in immunity by controlling the secretion of multiple cytokines, which normally act in a protective manner. However, these same cytokines are associated with many acute and chronic inflammatory diseases. Several studies have established

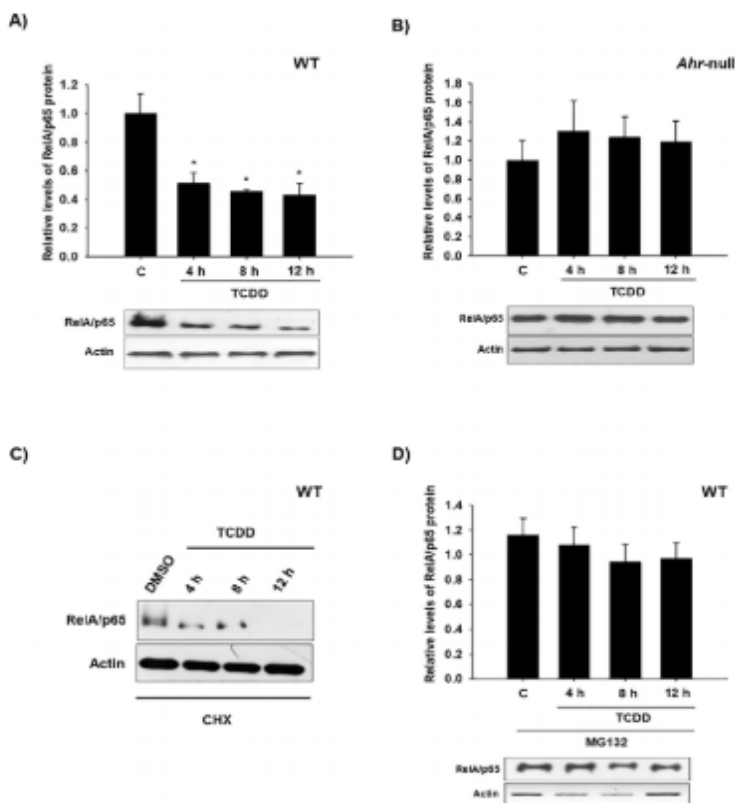


Fig. 3. TCDD induces RelA/p65 26S proteasome-dependent degradation. Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from WT (A) or *Ahr*-null (B) mice were treated with 10 nM TCDD. C) WT peritoneal macrophages were treated with cycloheximide (CHX, 10 μ g/mL) for 6 h to inhibit the *de novo* protein synthesis and harvested at the indicated times. D) WT peritoneal macrophages were co-treated with 10 nM TCDD and 25 μ M MG132 at the indicated times. RelA/p65 protein levels were determined by Western blot. Representative blots and densitometric scanning of the blots are shown. DMSO was used as a control and β -actin as a loading control. The data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$, control vs. treatments.

that AhR acts as a negative regulator of the immune response by inhibiting the expression of inflammatory cytokines [12,13], but the mechanism is not well understood. Therefore, the goal of the present study was to investigate whether AhR regulates cytokine expression in peritoneal mouse macrophages by modifying the RelA/p65 protein levels.

Initially, the protein levels of pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages of WT mice were measured. The induction of TNF- α , IL-6 and IL-12 after LPS and IFN γ stimulation was inhibited by activation of AhR. In contrast, β NF and TCDD failed to inhibit the pro-inflammatory cytokine induction when *Ahr*-null macrophages were used. Moreover, after LPS and IFN γ stimulation, *Ahr*-null macrophages presented up to 3.8 and 16 times more TNF- α and IL-6, respectively, than WT macrophages. These data are consistent with previous results showing that after 24 h of LPS treatment, *Ahr*-null macrophages produce higher TNF- α , IL-6 and IL-12 protein levels compared to WT cells [12] and confirm the negative regulatory function of AhR over the pro-inflammatory cytokine levels.

Others proposed that AhR negatively regulates pro-inflammatory cytokines by suppressing NF- κ B transcriptional activity through interaction with STAT1 [12]. Alternatively, AhR might act by promoting RelA/p65 protein degradation. We previously reported that activation of AhR mediates the ubiquitination and proteasome degradation of p53 and c-Fos by inducing the expression of UbcH7 (also known as Ube2L3 or UbcM4), an E2 ubiquitin enzyme [22,23]. Treatment of WT macrophages with the AhR agonist TCDD resulted in the ubiquitination of RelA/p65, together with a decrease in protein level. In contrast, TCDD

failed to induce these effects when *Ahr*-null macrophages were used. Additionally, inhibition of the 26S proteasome blocked the TCDD-induced RelA/p65 protein degradation. Taken together, these data indicate that activation of AhR promotes RelA/p65 protein ubiquitination and degradation by the ubiquitin proteasome system (UPS).

Inhibition of transcription abrogates RelA/p65 protein ubiquitination and degradation mediated by AhR, indicating that the transcriptional activity of AhR may be required. These data also suggest that, as in the case of c-Fos and p53, AhR might induce the expression of an ubiquitin enzyme involved in RelA/p65 ubiquitination. RelA/p65 is ubiquitinated for proteasome degradation in the cytosol by PPAR γ [31–33]. It can also be tagged with ubiquitin in the nucleus by the SOCS1/COMMD1 complex [34–36], PDLIM2 [37] and UbcH3 [28]. Therefore, overexpression of one or more of these ubiquitinating enzymes can lead to an increase in the degradation of RelA/p65 via UPS. Considering the above, we are currently investigating whether the expression of any of these genes is under the control of AhR.

Recently, it was shown that AhR is part of the cullin 4B ubiquitin ligase complex, involve in estrogen receptor α and androgen receptor degradation [38]. Therefore, in addition to the possibility of inducing the expression of ubiquitinating proteins, the AhR might promote the degradation of RelA/p65 through being part of a ubiquitinating complex.

TCDD promotes RelA/p65 ubiquitination after 12 h of treatment. However, a decrease in RelA/p65 protein levels was observed after 4 h of treatment, indicating the potential involvement of another degradation pathway, different from UPS. Autophagy describes a group of

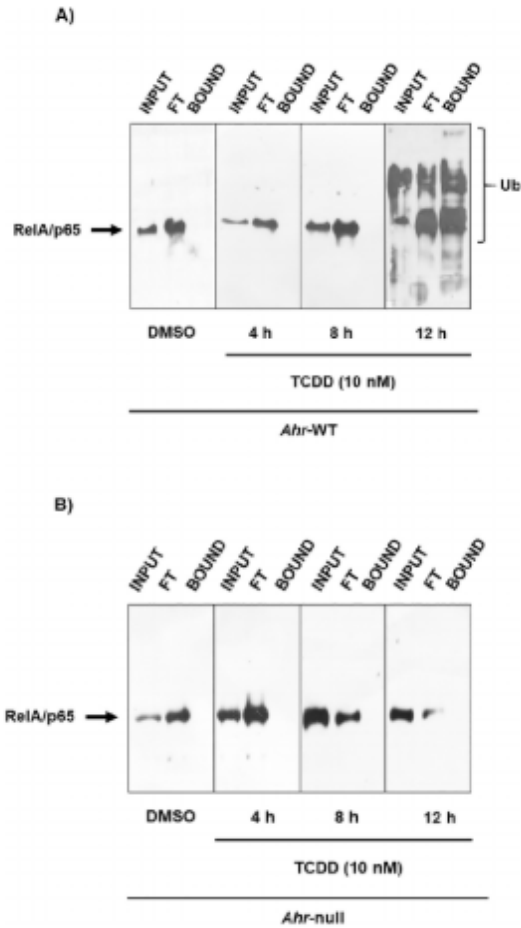


Fig. 4. AhR activation promotes RelA/p65 ubiquitination. Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from WT (A) and Ahr-null (B) mice were treated with 10 nM TCDD for 4, 8 and 12 h, and ubiquitinated proteins were captured using TUBEs, as described in the Material and Methods section. RelA/p65 was evaluated by Western blot. DMSO was used as a control. Representative blots of each fraction (Input, Flowthrough and Bound) corresponding to three independent experiments are shown.

at least three evolutionary conserved cellular degradation processes in eukaryotes that deliver cytoplasmic constituents for lysosomal degradation [39]. Among them, macroautophagy is characterized by *de novo* formation of a double membrane engulfed vesicle (autophagosomes) which then fuses with lysosomes for the degradation of its cargo [40]. TCDD treatment also results in the reversible formation of vacuoles in peritoneal macrophages after 4 h, and inhibition of lysosomal activity abrogates the RelA/p65 protein degradation induced by TCDD after 4 and 8 h of treatment, indicating that TCDD also promotes RelA/p65 lysosomal degradation. These results are supported by recent studies showing that RelA/p65 is also degraded by macrophagy [41,42] and that NF- κ B activation represses autophagy [43].

The AhR-induced RelA/p65 proteasomal degradation, as was expected, affects the level of activated RelA/p65, as revealed by Western blot and confocal microscopy imaging. LPS and IFN γ activated

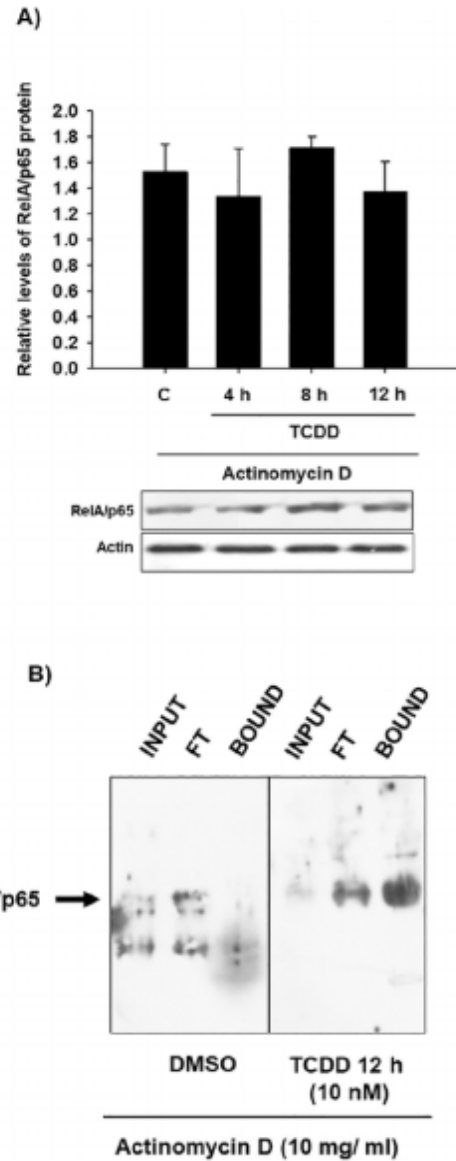


Fig. 5. RelA/p65 protein ubiquitination and degradation induced by TCDD depend on the transcriptional activity. Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from WT mice were pretreated with 10 mg/mL actinomycin-D for 10 min, followed by treatment with 10 nM TCDD at the indicated times. RelA/p65 protein (A) and ubiquitinated levels (B) were determined using TUBEs and Western blot. Representative blots and densitometric scanning of the blots are shown. DMSO was used as a control and β -actin as a loading control. The data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

macrophages presented a 60% and 90% decrease in P-RelA/p65 levels after 8 and 12 h, respectively, of TCDD pretreatment, when compared to controls. Interestingly, confocal microscopy analysis also showed

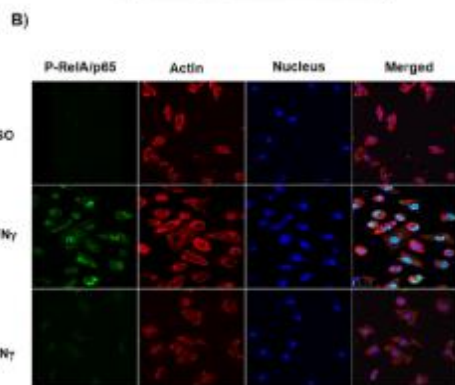
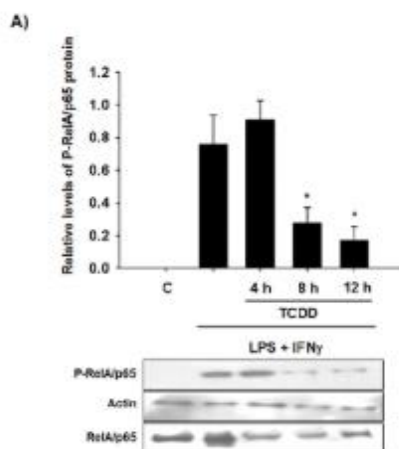


Fig. 6. TCDD promotes P-RelA/p65 degradation in WT mouse macrophages. Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from WT mice were pretreated with 10 nM TCDD at the indicated times and activated with LPS/IFN γ (1 μ g/mL and 20 ng/mL, respectively) for 30 min. Control cultures were activated with LPS/IFN γ . A) P-RelA/p65 and RelA/p65 were determined by Western blot. Representative blots and densitometric scanning of the blots are shown. β -Actin was used as a loading control. The data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$, control vs. treatments. B) Representative confocal microscopy images of P-RelA/p65 are shown after macrophage activation only or after 12 h of TCDD pretreatment and LPS/IFN γ . P-RelA/p65, actin, and DAPI were visualized as green, red, and blue, respectively. DMSO was used as a control. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that *Ahr*-null macrophages presented a signal for P-RelA/p65 under control conditions, suggesting that absence of AhR promotes the phosphorylation of RelA/p65. This observation is in agreement with a previous report showing that non-activated *Ahr*-null macrophages presented higher levels of pro-inflammatory cytokines compared with WT cells [13]. The reason for this is unknown. However, an explanation could be found in the role that the AhR interacting protein (AIP) plays in regulation of the NF- κ B signaling pathway. Recently, it was shown in T cells that through its interaction with CARMA1, AIP enhances the formation of the CARMA1-BCL10-MALT1 complex (CBM), promoting NF- κ B activation [44]. In macrophages, the CBM complex is essential for dectin-1-induced NF- κ B activation [45]. Therefore, the absence of AhR

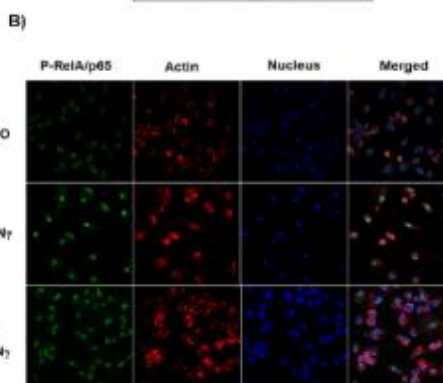
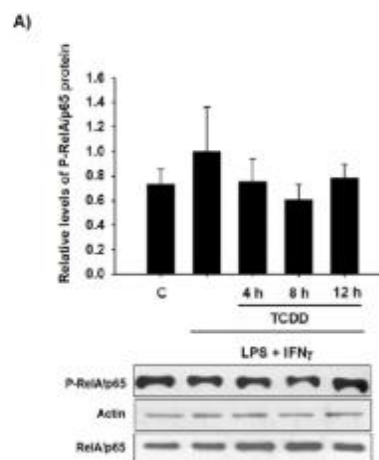


Fig. 7. TCDD failed to promote P-RelA/p65 degradation in *Ahr*-null mouse macrophages. Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from *Ahr*-null mice were pretreated with 10 nM TCDD at the indicated times and activated with LPS/IFN γ (1 μ g/mL and 20 ng/mL, respectively) for 30 min. Control cultures were activated with LPS/IFN γ . A) P-RelA/p65 and RelA/p65 were determined by Western blot. Representative blots and densitometric scanning of the blots are shown. β -actin was used as a loading control. The data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. B) Representative confocal microscopy images of P-RelA/p65 are shown after macrophage activation only or after 12 h of TCDD pretreatment and LPS/IFN γ . P-RelA/p65, β -actin, and DAPI were visualized as green, red, and blue, respectively. DMSO was used as a control. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

might result in increased free AIP, favoring its interaction with CARMA1, with its consequent increase in inflammatory cytokines. Alternatively, AhR might block the NF- κ B signaling pathway through its interaction with IKK α as Kurita and collaborators recently showed [46]. Therefore, the absence of AhR would promote a greater availability of IKK α , which in turn favors NF- κ B activation.

In conclusion, AhR activation promotes RelA/p65 protein degradation through the LPS, as well as through lysosomes, resulting in a decreased pro-inflammatory cytokine level in mouse macrophages. To our knowledge, this is the first report that establishes a relationship between AhR, RelA/p65 ubiquitination and lysosomal degradation. More studies are needed to identify the putative ubiquitin enzymes under the regulation of the AhR that are involved in RelA/p65

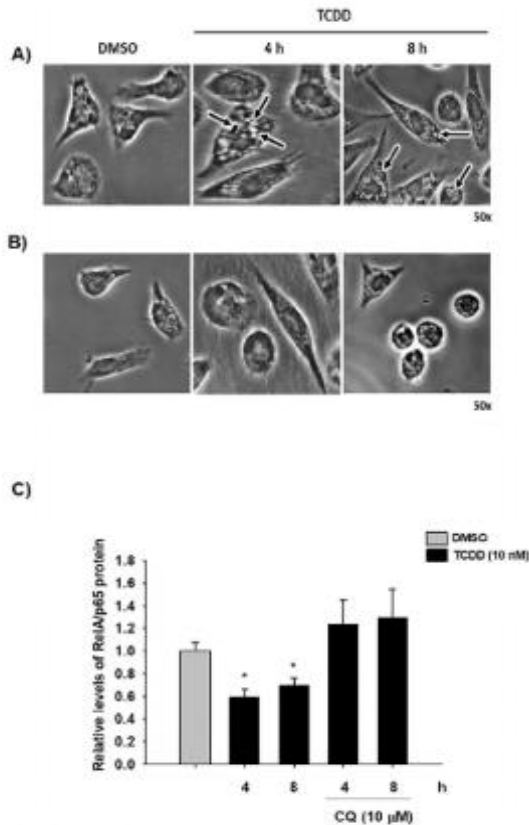


Fig. 8. TCDD induces RelA/p65 lysosome-dependent degradation. Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from WT mice were visualized by phase contrast microscopy after 10 nM TCDD treatment (A) and after cell cultures were washed and cultured for another 12 h in fresh control media (B). The arrows point to vacuoles. C) Peritoneal macrophages (1×10^6 cells/mL) from WT mice were treated with 10 nM TCDD or were co-treated with 10 nM TCDD and 10 μM chloroquine (CQ) at the indicated times, and RelA/p65 protein levels were determined by Western blot. Densitometric scanning of the blots are shown. DMSO was used as a control and β -actin as a loading control. The results are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$, control vs. treatments.

ubiquitination and to determine whether the absence of AhR would promote a greater availability of IKK α and free AIP together with NF- κ B signaling activation in macrophages.

Acknowledgement

This work was supported by CONACYT grant 153377.

References

- J.C. Bowlands, J.A. Gustafson, Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction, *Crit. Rev. Toxicol.* 27 (1997) 109–134.
- G.P. Labvis, S.L. Lindell, R.S. Thomas, R.S. McCaskey, C. Murphy, E. Glover, et al., Perinatal systemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice, *PNAS* 97 (2000) 10442–10447.
- S.E. Latchney, A.M. Hein, M.K. O'Banion, E. DiCiccio-Bloom, L.A. Opanashuk, Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory, *J. Neurochem.* 125 (2013) 430–445.
- S. Sato, H. Shirakawa, S. Tomita, Y. Ohsaki, K. Hakem, O. Tooti, et al., Low-dose dioxin alters gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229 (2008) 10–19.
- O.D. Reyes-Hernandez, A. Mejía-García, E.M. Sánchez-Ocampo, F. Castro-Munozledo, R. Hernández-Munoz, G. Elizondo, Aromatic hydrocarbons upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and induce changes in actin cytoskeleton. Role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), *Toxicology* 266 (2009) 30–37.
- G. Elizondo, P. Fernández-Salguero, M.S. Sheikh, G.Y. Kim, A.J. Fornace, K.S. Lee, et al., Altered cell cycle control at the G2/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 1056–1063.
- P. Fernández-Salguero, T. Pinson, D.M. Hilbert, T. McPhail, S.S. Lee, S. Kimura, et al., Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor, *Science* 268 (1995) 722–726.
- C. Esser, The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 597–607.
- N.J. Kerkvliet, AhR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 745–760.
- F.J. Quintana, A.S. Basco, A.H. Iglesias, T. Koen, M.F. Farez, E. Bernelli, et al., Control of T(reg) and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor, *Nature* 453 (2008) 65–71.
- M. Rodríguez-Sosa, G. Elizondo, R.M. López-Durrón, I. Rivera, F.J. González, L. Vega, Over-production of IFN- γ and IL-12 in AhR-null mice, *FEBS Lett.* 570 (2005) 6403–6410.
- A. Kimura, T. Naka, T. Nakahama, I. Chinen, K. Masuda, K. Nobana, et al., Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 2027–2035.
- S. Climaco-Ariza, D. Domínguez-Acosta, M.A. Cabanas-Cortes, M. Rodríguez-Sosa, F.J. González, L. Vega, et al., Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization, *Life Sci.* 155 (2016) 76–84.
- G. Elizondo, M. Rodríguez-Sosa, E. Estrada-Muniz, F.J. González, L. Vega, Deletion of the aryl hydrocarbon receptor enhances the inflammatory response to *Leishmania major* infection, *Int. J. Biol. Sci.* 7 (2011) 1220–1229.
- Y. Sánchez, D. Rosado Jde, L. Vega, G. Elizondo, E. Estrada-Muniz, R. Saavedra, et al., The unexpected role for the aryl hydrocarbon receptor on susceptibility to experimental toxoplasmosis, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010) 505694.
- O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell* 140 (2010) 805–820.
- B. Schaub, A. Belloni, F.K. Gibbons, G. Velasco, M. Campo, H. He, et al., TLR2 and TLR4 stimulation differentially induce cytokine secretion in human neonatal, adult, and murine mononuclear cells, *J. Interferon Cytokine Res.* 24 (2004) 543–552.
- K.A. Fitzgerald, D.C. Rowe, B.J. Barnes, D.B. Caffrey, A. Vissintin, E. Latz, et al., LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adaptors TRAM and TRIF, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1043–1055.
- T.H. Thatcher, S.B. Muggirwar, C.J. Baghote, H.F. Lukats, T.A. Gasiewicz, R.P. Philpott, et al., Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice develop heightened inflammatory responses to cigarette smoke and endotoxin associated with rapid loss of the nuclear factor- κ B component RelB, *Am. J. Pathol.* 170 (2007) 855–864.
- C.F. Vogel, E. Scialto, W. Li, P. Wong, G. Lazzarini, F. Matsumura, RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 2941–2955.
- Y. Tian, S. Ke, M.S. Denton, A.B. Rabson, M.A. Gallo, Ah receptor and NF- κ B interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 510–515.
- O.D. Reyes-Hernandez, A. Mejía-García, E.M. Sánchez-Ocampo, M.A. Cabanas-Cortes, P. Ramírez, L. Chavez-Gonzalez, et al., Ube23 gene expression is modulated by activation of the aryl hydrocarbon receptor: implications for p53 ubiquitination, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 932–940.
- A. Mejía-García, E. González-Barbosa, C. Martínez-Guzmán, M.A. Torres-Ramos, M.S. Rodríguez, S. Guzmán-León, et al., Activation of AhR mediates the ubiquitination and proteasome degradation of c-Fos through the induction of Ube24 gene expression, *Toxicology* 337 (2015) 47–57.
- R. Hjerpe, F. Allet, F. Lupitz-Orosa, V. Laog, P. Englund, M.S. Rodríguez, Efficient protection and isolation of ubiquitinated proteins using tandem ubiquitin-binding entities, *EMBO Rep.* 10 (2009) 1250–1258.
- F. Allet, F. Lupitz-Orosa, R. Hjerpe, M. Torres-Ramos, V. Laog, M.S. Rodríguez, Isolation of ubiquitinated proteins using tandem ubiquitin-binding entities, *Methods Mol. Biol.* 832 (2012) 173–183.
- H. Sekine, J. Mimura, M. Oshima, H. Okawa, J. Kanno, K. Igarashi, et al., Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 6391–6400.
- M.S. Hayden, A.P. West, S. Ghosh, NF- κ B and the immune response, *Oncogene* 25 (2006) 6758–6780.
- Y. Hsu, Z. Zhang, Q. Xu, H. Wang, Y. Xu, K. Chen, Inhibitor of growth 4 induces NF- κ B/p65 ubiquitin-dependent degradation, *Oncogene* 33 (2014) 1997–2003.
- F.A. Salomons, K. Acs, N.P. Dantuma, Illuminating the ubiquitin/proteasome system, *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 1289–1295.
- T. Kiriake, Y. Ichimura, H. Okada, Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Yoshimori, et al., The reversible modification regulates the membrane-binding state of Atg9/Aut9 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 263–276.
- S.W. Chung, B.Y. Kang, S.H. Kim, Y.K. Pak, D. Cho, G. Trinchieri, et al., Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome

- proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32681–32687.
- [32] D. Kelly, J.I. Campbell, T.P. King, G. Grant, E.A. Jansson, A.G. Coutts, et al., Commercial anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 104–112.
- [33] Y. Hou, F. Moreau, K. Chadee, PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NF-kappaB/p65, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1300.
- [34] E. Burstein, J.E. Hoberg, A.S. Wilkinson, J.M. Rumble, R.A. Gomes, C.M. Komarek, et al., COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22222–22232.
- [35] J. Strehovský, P. Walker, R. Laag, A.H. Dalpke, Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NF-kappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus, *FASEB J.* 25 (2011) 863–874.
- [36] G.N. Maine, E. Burstein, COMMD proteins: COMMDing to the scene, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 1997–2005.
- [37] T. Tanaka, M.J. Grusby, T. Kaisho, PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 584–591.
- [38] F. Ohtake, A. Baba, I. Takada, M. Okada, K. Iwasaki, H. Miki, et al., Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase, *Nature* 446 (2007) 562–566.
- [39] N. Mizushima, D.J. Klionsky, Protein turnover via autophagy: implications for metabolism, *Annu. Rev. Nutr.* 27 (2007) 19–40.
- [40] C. Munz, Macroautophagy during innate immune activation, *Front. Microbiol.* 2 (2011) 72.
- [41] C.P. Chang, Y.C. Su, C.W. Hu, H.Y. Li, TLR2-dependent selective autophagy regulates NF-kappaB lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation, *Cell Death Differ.* 20 (2013) 515–523.
- [42] J. Tang, M.N. Zhan, Q.Q. Yin, C.X. Zhou, C.L. Wang, L.L. Wu, et al., Impaired p65 degradation by decreased chaperone-mediated autophagy activity facilitates epithelial-to-mesenchymal transition, *Oncogenesis* 6 (2017) e387.
- [43] M. Djavaheri-Mergny, M. Amelotti, J. Mathieu, F. Besancon, C. Bauvy, S. Souquere, et al., NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 30373–30382.
- [44] G. Schimmsack, A.C. Eitelhuber, M. Vincendeau, K. Demski, H. Shinohara, T. Kurtsak, et al., AIP augments CARMA1-BCL10-MALT1 complex formation to facilitate NF-kappaB signaling upon T cell activation, *Cell Commun. Signal.* 12 (2014) 49.
- [45] H. Hara, T. Saito, CARE9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity, *Trends Immunol.* 30 (2009) 234–242.
- [46] H. Karina, M. Schmeckenburger, J.L. Ovesen, Y. Xia, A. Puga, The Ah receptor recruits IKKalpha to its target binding motifs to phosphorylate serine-10 in histone H3 required for transcriptional activation, *Toxicol. Sci.* 139 (2014) 121–132.