



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“Caracterización molecular de la expresión del gen
de Parkina (*PRKN*) mediada por el AHR en células
de neuroblastoma humano”**

TESIS

Que presenta

M. en C. FÁTIMA ELIZABETH MURILLO GONZÁLEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOLOGÍA CELULAR

Director de la tesis: Dr. Guillermo Elizondo Azuela

Dedicatorias

Para Emilio.

Por ser mi mayor fuente de inspiración, mi motor, mi pilar más fuerte y mi lugar seguro. Gracias por nunca dejarme rendirme, gracias por ser tú.

A mis padres, ya que gran parte de todo lo que hago es por ellos. Gracias por su apoyo incondicional y su gran amor. Este trabajo también es fruto de todo lo que me han inculcado.

A mis hermanos, sé que aun a la distancia siempre estaremos el uno para el otro.

A mi familia de Nayarit que siempre me han llenado de ánimo y motivación para seguir cumpliendo mis metas.

A mi familia Avila Rodríguez que han sido parte muy importante en este camino, gracias por recibirme con mucho amor y por su apoyo incondicional.

A mis sobrinos, mis niños Emilio Zaid, Valentina y Andrea victoria. Son una nueva luz en mi vida.

A mis ángeles, mi abuelita **Chavita**, mi primo **Vicent**, mis abuelitos **Carlos y Vicente** y a mi tío **Nana**, espero que donde quiera que se encuentren, estén orgullosos de mí.

Agradecimientos

Al **Dr. Guillermo Elizondo Azuela** por su invaluable guía, por la confianza que me brindó para desarrollarme en varios proyectos de investigación, por sus consejos, por ayudarme a moldear mi formación en la investigación científica, por ser para mí un gran ejemplo como investigador y como persona. Gracias por todo lo que me ha enseñado y gracias también por su amistad.

A la **Dra. Irma Martha Medina Díaz** porque sembró en mi la semilla de ser investigadora y por ser para mí un gran ejemplo de profesional y ser humano.

A mis asesores: **Dr. Saúl Villa Treviño, Dr. José Eduardo Pérez Salazar, Dr. Efraín Garrido Guerrero, Dr. Alejandro Manuel García Carrancá** por sus valiosas sugerencias, comentarios y consejos durante mis seminarios de avance.

A la **Dra. María Asunción Cabañas** por su apoyo técnico en el cultivo celular, las técnicas de PCR, Western blot, clonación de plásmidos y transfección celular. Gracias también por su invaluable amistad.

Al **Dr. Jorge Humberto Limón Pacheco** por su apoyo técnico en los ensayos de ChIP y sus consejos en el perfeccionamiento de la técnica de PCR. Gracias también por su amistad.

A **Salvador Portilla** por su valioso apoyo técnico en la preparación de reactivos y material de laboratorio.

A la **Dra. Rosario García Aguilar** por la amistad tan bonita que formamos y su apoyo durante toda la realización de mi proyecto.

A **Clara Hernández** por su valioso apoyo en trámites administrativos, por siempre tener la disposición de ayudarme y resolver todas mis dudas.

Al **Dr. Raúl Bonilla Moreno** por su asesoría en la transformación bacteriana.

A la **M. en C. Laura López Bañuelos** por su amistad y su apoyo moral en esta etapa de doctorado.

A la **M. en C. Karen Hernández García** por enseñarme las bases del diseño de primers y su apoyo en la ligación del vector recombinante durante la clonación.

A la **M. en C. Elizabeth Estrada Muñiz** por su apoyo en la técnica de PCR en punto final durante mis primeros experimentos.

A la **Dra. Libia Vega Loyo** por sus consejos durante los seminarios internos.

A mis amigos y compañeros del **laboratorio 20** por su valiosa amistad, por sus sugerencias, por escucharme y por todos los momentos compartidos.

Al laboratorio **DILETEC**, en especial al **Q.F.B. Victor Hugo Rosales**, al **Lic. Carlos Jiménez** y al **Lic. Rodrigo Jiménez** por abrirme las puertas y darme la oportunidad de combinar mis estudios y trabajo en el último año de mi doctorado.

A mi compañero de trabajo **Enrique Tellez** por su apoyo en DILETEC cuando me encontraba atareada con experimentos y trámites finales en CINVESTAV.

A todas las personas que me brindaron palabras de aliento, una sonrisa y a quienes estuve presente en sus oraciones, muchas gracias.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por la oportunidad brindada.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo económico brindado con el **No. CVU: 739785**.

Finalmente, y más importante, **gracias a Dios**, porque es quien ha guiado mi pasos, mis acciones y mi vida.

Índice

	Pág.
Lista de tablas.....	8
Lista de figuras.....	9
Abreviaturas.....	11
Resumen.....	13
Abstract.....	14
1.Introducción.....	15
1.1.Características generales de la Parkina.....	15
1.2.Regulación de la Parkina.....	16
1.3.El receptor para hidrocarburos de arilo (AHR).....	17
1.3.1.Vías de señalización del AHR.....	20
1.3.1.1.Vía genómica canónica del AHR.....	21
1.3.1.2.Vía genómica no canónica del AHR.....	22
1.3.1.3.Vías no genómicas del AHR.....	22
1.3.2.Ligandos del AHR.....	23
1.4.La Parkina como blanco potencial del AHR.....	24
2.Justificación.....	26
3.Hipótesis.....	27
4.Objetivos.....	28
4.1.Objetivo general.....	28
4.2.Objetivos específicos.....	28
5.Materiales y métodos.....	29

5.1.Cultivo celular	29
5.2.Condiciones de tratamientos: ensayo de MTT	30
5.3.Análisis <i>in silico</i> del promotor del gen <i>PRKN</i>	31
5.4. Homología de secuencias de los XREs en el promotor del gen <i>PRKN</i> en diferentes especies.....	32
5.5.Redes de interacción de FT que regulan a <i>PRKN</i>	32
5.6.Evaluación de los niveles de ARNm de <i>CYP1A1</i> , <i>PRKN</i> y <i>ATF4</i>	33
5.6.1.Extracción de ARN total.....	33
5.6.2.Síntesis de cDNA	34
5.6.3.PCR cuantitativa (qPCR)	34
5.7.Evaluación de la localización subcelular del AHR por medio de inmunofluorescencia.....	35
5.8..Evaluación de los niveles de proteína de Parkina, <i>CYP1A1</i> , <i>ATF4</i> , <i>GRP78</i> y β - actina	36
5.8.1.Extracción de proteínas totales de cultivos celulares	36
5.8.2.Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford	36
5.8.3.Western Blot	37
5.9.Ensayos de transactivación del promotor del gen <i>PRKN</i>	38
5.9.1. Clonación del promotor del gen de <i>PRKN</i> en el vector reportero de luciferasa	38
5.9.2.Ensayos de mutagénesis dirigida del sitio de unión XRE2.....	39
5.9.3. Transfección de células SH-SY5Y con los vectores pGL4- <i>PRKN</i> (-970/+15) y pGL4- <i>PRKN</i> -XRE2-MUT y ensayos de transactivación.....	47
5.9.4.Evaluación de la unión del AHR al promotor del gen <i>PRKN</i> mediante el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	42

5.9.5.Análisis estadístico.....	44
6.Resultados.....	45
7.Discusión.....	68
8.Conclusiones.....	75
9.Perspectivas.....	77
10.Apéndice I.....	78
11.Apéndice II.....	79
12.Referencias.....	80

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Protocolo de amplificación de ARNm de los genes de interés mediante qPCR.	35
Tabla 2. Parámetros para la PCR punto final para mutagénesis dirigida.	39
Tabla 3. Protocolo para el realineamiento del plásmido sometido a mutagénesis.	40

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Alineamiento pareado de los promotores génicos de PRKN de humano y de ratón..	17
Figura 2. Estructura del AHR humano..	19
Figura 3. Vías de señalización del AHR.....	20
Figura 4. Ensayos de MTT.....	31
Figura 5. Análisis in silico de los SUFT en la región promotora del gen PRKN (-500 bp/+100 bp).....	46
Figura 6. Análisis de homología de secuencias de los XREs identificados en el promotor del gen PRKN.....	47
Figura 7. Evaluación de la funcionalidad transcripcional del AHR en células SH-SY5Y.....	49
Figura 8. Efectos del TCDD sobre la expresión de la Parkina.	51
Figura 9. Caracterización del vector recombinante pGL4-PRKN (-970/+15) mediante digestiones con las enzimas de restricción KpnI y XhoI.....	52
Figura 10. Caracterización de la regulación transcripcional del gen PRKN mediada por el AHR activado con TCDD.....	54
Figura 11. Análisis de las redes de interacción de los posibles intermediarios en el eje AHR-PRKN.....	57
Figura 12. Efectos del AHR activado por TCDD sobre los niveles de expresión de ATF4 y el estrés del RE.....	59
Figura 13. Efectos del AHR activado por quinurenina sobre los niveles de ARNm de Parkina.....	62

Figura 14. Caracterización de la regulación transcripcional del gen PRKN mediada por el AHR activado con quinurenina.	64
Figura 15. Efectos del AHR activado con quinurenina sobre los niveles de proteína de Parkina, GRP78 y ATF4.....	65
Figura 16. Comparación del efecto de diferentes ligandos del AHR sobre los niveles de expresión de ARNm de PRKN..	66
Figura 17. Mecanismos de regulación del gen PRKN humano mediado por el AHR.....	76

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHR	Receptor para hidrocarburos de arilo
AHRR	Represor para el receptor para hidrocarburos de arilo
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNT	Translocador nuclear del AHR
ATF4	Factor de transcripción activador 4
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
BSA	Albúmina sérica bovina
CREB	Elemento de unión de respuesta a cAMP
CT	Ciclo umbral
CYP	Citocromo P-450
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DMEM-F12	Medio de célula modificada de Dulbecco F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EBI	Instituto de Bioinformática Europeo de EMBL
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética
EPD	Base de datos de promotores eucariotes
FDR	Tasa de descubrimiento falso
FICZ	6-Formilindolo[3,2-b]carbazol
FT	Factor de transcripción
GRP78	Proteína regulada por glucosa 78
HIF1a	Factor 1-alfa inducible por hipoxia
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferasa
ITE	Ácido metil ester 2-(1'H-indol-3'-carbonil)-tiazol-4-carboxílico
KEGG	Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas

LB	Luria-Bertani
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NB	Neuroblastoma
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ND	No diferenciadas
NRF1	Factor nuclear respiratorio 1
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PD	Enfermedad de Parkinson
PMID	Identificador de PubMed
PRKN	Gen de la Parkina humana
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplásmico
REV	Oligonucleótido antisentido
RT-qPCR	PCR cuantitativa con retro-transcripción
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEN	Señal de exporte nuclear
SFB	Suero fetal bovino
SIM	Proteína de mente única
SLN	Señal de localización nuclear
SNC	Sistema nervioso central
SUFT	Sitio de unión de factor de transcripción
TAD	Dominio de transactivación
TBS	Tris-amortiguador salino
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
Trp	Triptófano
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UPR	Respuesta de proteínas mal plegadas
WT	Wild Type, silvestre
XRE	Elemento de respuesta para xenobióticos

Resumen

La Parkina es una enzima E3 ligasa que regula la degradación de proteínas y la mitofagia en neuronas dopaminérgicas. Las deficiencias en su expresión o función resultan en estrés celular, degeneración y eventualmente la muerte de las neuronas dopaminérgicas, lo que contribuye al desarrollo de Parkinson. Por el contrario, la sobreexpresión de Parkina promueve la supervivencia neuronal. Estudios previos han demostrado que el Receptor para Hidrocarburos de Arilo (AHR), un factor de transcripción (FT) activado por ligando, induce la expresión de la Parkina en el mesencéfalo de ratón; sin embargo, se desconoce si estos efectos también se pueden observar en el humano. En este estudio, describimos el mecanismo molecular por el cual el AHR regula la expresión de la Parkina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, utilizando dos agonistas del AHR: el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) y el catabolito de Triptófano, la quinurenina. Los resultados demuestran que el AHR regula el gen de la Parkina humano (*PRKN*) a través de dos vías distintas dependiendo del ligando. La activación del AHR con TCDD promueve la expresión de la Parkina de manera indirecta al inducir el estrés del retículo endoplásmico y la expresión de ATF4 mediada por el AHR. ATF4 es un FT clave para la inducción de *PRKN* en condiciones de estrés. Por otro lado, la quinurenina, un agonista de AHR no tóxico, induce directamente la expresión de la Parkina al promover la unión de AHR al promotor del gen *PRKN* sin inducir estrés del retículo endoplásmico. Nuestros hallazgos demuestran que la activación del AHR representa una vía farmacológica potencial para inducir la Parkina humana. Sin embargo, se debe prestar atención a la naturaleza del ligando del AHR para mitigar los posibles efectos neurotóxicos secundarios.

Abstract

Parkin is an E3 ligase enzyme that play a crucial role in regulating protein degradation and mitophagy within dopaminergic neurons. Deficiencies in Parkin expression or function result in cellular stress, degeneration, and eventual death of dopaminergic neurons, thus contributing to the development of Parkinson's disease. Conversely, upregulation of Parkin has been found to enhance neuronal survival. Previous research has shown that the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) mediates Parkin upregulation in mice; however, the precise mechanism underlying AHR-mediated Parkin upregulation in human cells remains unclear. In this study, we described the molecular mechanism by which AHR mediates the upregulation of Parkin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells, using two AHR agonists: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and the kynurenine, a catabolite of tryptophan. Our findings reveal that AHR regulates human Parkin gene (*PRKN*) via two distinct pathways depending on the ligand involved. The TCDD-induced Parkin upregulation involves the induction of endoplasmic reticulum stress and the AHR-mediated induction of ATF4, a crucial transcription factor for *PRKN*. Conversely, kynurenine, a nontoxic AHR agonist, directly stimulated Parkin transcription by facilitating AHR binding to the *PRKN* gene promoter without activating endoplasmic reticulum stress pathways. Our findings demonstrate that AHR activation represents a potential pharmacological pathway to induce human Parkin. However, careful considerations of the AHR ligand's properties are essential to mitigate potential neurotoxic side effects.

1. Introducción

1.1. Características generales de la Parkina

La Parkina es una enzima ubiquitina E3 ligasa de 52 kDa que es codificada por el gen *PRKN* (también conocido como *PARK2*). Esta enzima juega un papel importante en el sistema ubiquitina-proteasoma marcando proteínas para su degradación a través del proteasoma de 26S (1). La función más importante de la Parkina ha sido descrita en el control de calidad mitocondrial a través de la regulación de la mitofagia, especialmente en las neuronas dopaminérgicas (2). La pérdida de la función de la Parkina conduce a la acumulación progresiva de sus sustratos, lo que lleva al estrés celular, degeneración y la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Estos procesos neurotóxicos son un mecanismo que con el tiempo conducen a la enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés) (3). Además, las mutaciones en el gen *PRKN* que resultan en la pérdida de su función están asociadas tanto con el PD de origen esporádico como con el parkinsonismo juvenil autosómico recesivo (4, 5).

Se han descrito varios sustratos de ubiquitinación de la Parkina, todos ellos relacionados con funciones celulares importantes como la regulación transcripcional génica, la estabilidad de proteínas, las respuestas al estrés del retículo endoplásmico (RE) y el control de calidad mitocondrial (6).

La Parkina también desempeña un papel protector en varios modelos de muerte neuronal. En estos, la sobreexpresión de Parkina incrementa la supervivencia de las neuronas (7-9), mientras que la regulación a la baja promueve la muerte celular (10). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos que inducen los niveles de expresión de Parkina y que puedan mejorar la supervivencia neuronal sirven potencialmente como estrategias terapéuticas para el PD y otras neuropatologías (11-14).

1.2. Regulación de la Parkina

Con el objetivo de identificar aquellas vías capaces de aumentar la expresión de la Parkina, varios estudios han realizado análisis del promotor del gen *PRKN*, algunos de ellos enfocados en los mecanismos mediante los cuales este promotor es regulado (12). Investigaciones basadas en modelos celulares han identificado compuestos capaces de aumentar la expresión de la Parkina, no obstante, es fundamental profundizar en el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que estimulan la expresión de esta importante enzima (13).

Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó que el TCDD, un ligando exógeno para el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR), aumenta los niveles de la Parkina en el mesencéfalo ventral del ratón (15). En ese estudio, se identificó una vía de regulación directa del gen *Prkn* de ratón mediada por el AHR, en la que dicho receptor se une a uno de los tres elementos de respuesta para xenobióticos (XREs, por sus siglas en inglés) localizados en el promotor génico murino. La unión del AHR al promotor indujo los niveles de expresión de ARNm y proteína de Parkina, lo suficiente como para lograr una disminución en los niveles basales de sus sustratos α -sinucleína y sinfilina-1, conocidos por promover mecanismos patológicos de Parkinson. Sin embargo, dada las diferencias entre los promotores de ratón y de humano (homología menor al 56.39%, Figura 1) es importante investigar si esta vía de señalización se conserva en células humanas.

96 kDA (22). Comenzando por la región N- terminal, el AHR consta de un dominio bHLH que está constituido por aminoácidos conservados que forman dos α -hélices anfipáticas conectadas a través de un giro “loop” relativamente no-conservado con una región de aminoácidos básicos adyacente. El dominio bHLH se encarga de la unión y reconocimiento de secuencias específicas en el ADN. El dominio PAS está localizado adyacente al dominio bHLH y contiene dos subdominios: PAS-A y PAS-B. Esta región comprende 250-300 aminoácidos y sirve como un sitio de acoplamiento molecular “docking” para interacciones proteína-proteína y unión a ligandos. Además, el dominio PAS también alberga la señal de localización nuclear (SLN) y la señal de exporte nuclear (SEN) requeridas para la activación del AHR. En la región C- terminal el AHR contiene un dominio de transactivación (TAD) rico en glutamina, indispensable para la activación génica debido a su interacción con varios co-activadores transcripcionales (20-22). Los análisis de homología de proteína entre el AHR murino y el humano han revelado aproximadamente un ~85% de identidad de secuencia en la mitad N-terminal del receptor, mientras que la mitad C-terminal exhibe solo un 58% de identidad debido a cambios en la región TAD (21). Es importante mencionar que la estructura de cristal completa del AHR humano no ha sido resuelta, debido a que el dominio PAS-B no puede ser expresado en forma soluble y generalmente forma agregados (20). Hasta ahora, sólo se han reportado las estructuras del dominio PAS-A (ratón) y la del bHLH-PAS (humano) heterodimerizada con el ARNT (ratón) por grupos de investigación separados (23-25).

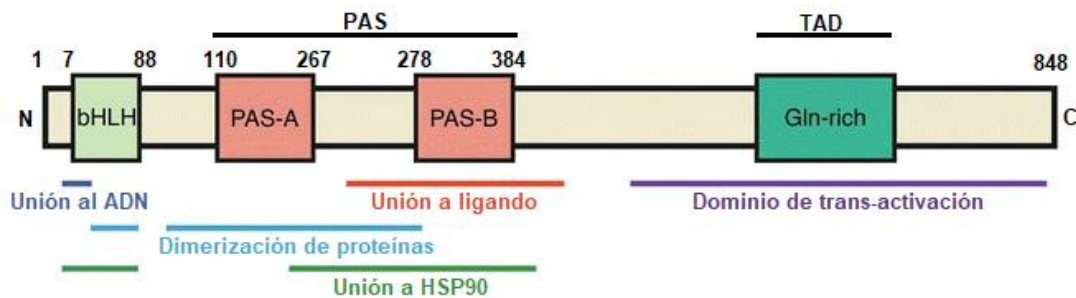


Figura 2. Estructura del AHR humano. La figura está basada en la estructura de la proteína anotada para el AHR murino. Adaptada de Wang et al., 2016 y Abel et al., 2010.

El AHR es conocido por regular la expresión de enzimas de biotransformación de fase I tales como las de la familia del citocromo P450: CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, y enzimas de biotransformación de fase II incluyendo UDP-glucuronosil transferasa 1A6 (UGT1A6), oxidoreductasa-1 dependiente de quinona (NQO1), la aldehído deshidrogenasa 3A1 (ALDH3A1) y la glutatión-S-transferasas alfa 1 (19, 26). Como FT, la principal función del AHR se ha descrito como mediador de la toxicidad de contaminantes ambientales; sin embargo, también se sabe que también participa en procesos fisiológicos y patofisiológicos importantes. Entre los patofisiológicos se encuentran desórdenes autoinmunes, escape inmune de células cancerosas, artritis reumatoide y esclerosis múltiple (19). Entre los fisiológicos, se encuentran la defensa del organismo contra patógenos y la homeostasis de las células intestinales por medio de mecanismos que incluyen la inmunidad, el mantenimiento de células madre y la diferenciación celular (18). Adicionalmente, estudios recientes sugieren la participación del AHR en la diferenciación neuronal embrionaria y el mantenimiento de células del sistema nervioso central (SNC) (27-30). La importancia del AHR en las células gliales y neuronas del SNC ha sido identificada por medio de fenotipos de ratón que carecen del AHR funcional donde la neurogénesis se ve alterada (30). Rothhammer y col. (31) reportaron que la pérdida del AHR resulta en la regulación positiva de genes asociados con la activación de la microglia, inflamación y neurodegeneración.

1.3.1. Vías de señalización del AHR

Tras la unión de un ligando agonista, el AHR se activa lo que resulta en su translocación al núcleo. En el núcleo, forma un complejo con el ARNT y se une a los elementos de respuesta de AHR:ARNT (también conocidos como XREs) ubicados en los promotores de sus genes blanco, induciendo así su transcripción (32). Adicionalmente, se han descrito otras vías de señalización del AHR, las cuales se muestran en la figura 3.

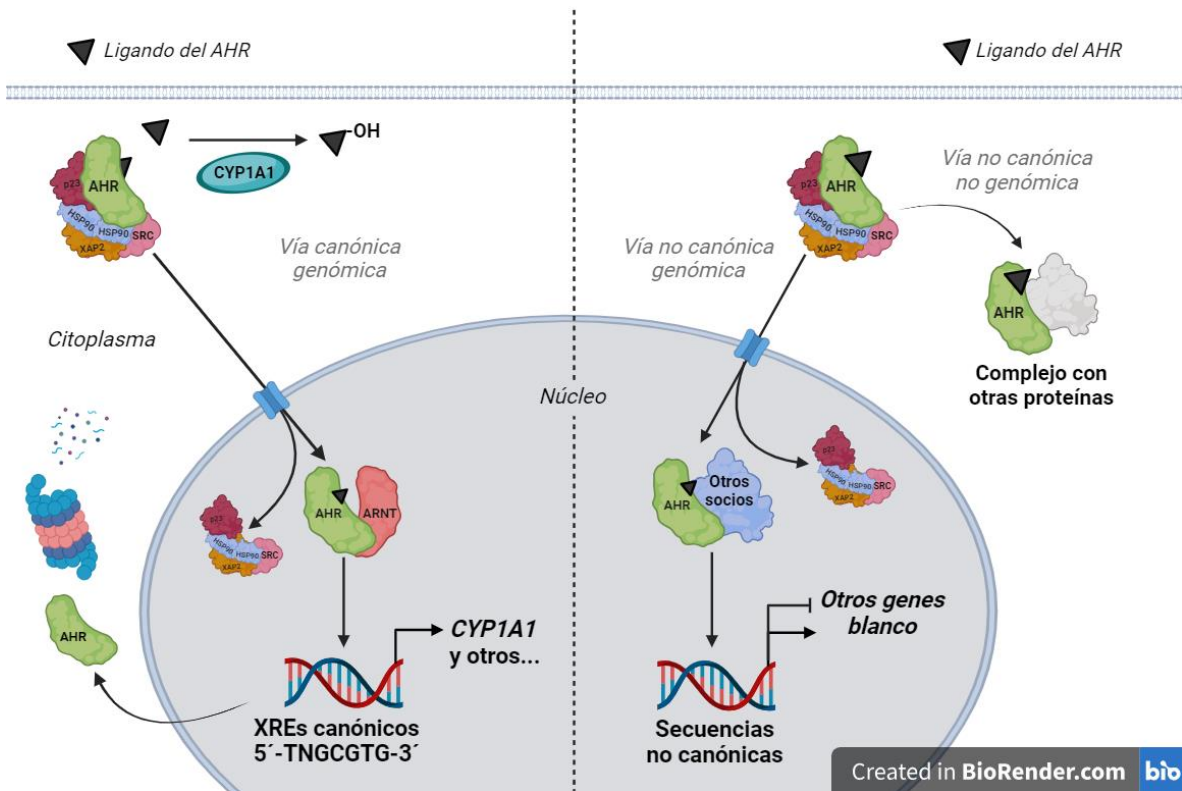


Figura 3. Vías de señalización del AHR. En la figura se describen las diferentes vías de señalización reportadas en las que participa el AHR. Entre ellas, se encuentran la vía canónica genómica donde el AHR se une al ARNT formando un heterodímero que regula genes por medio de la unión a secuencias canónicas tipo “TNGCGTG”, también se menciona la vía no canónica genómica donde el AHR se une a socios diferentes a ARNT y media la regulación génica por medio de la unión a secuencias no canónicas diferentes a “TNGCGTG”. Finalmente la vía no canónica no genómica donde el AHR participa como una E3 ligasa formando complejo con otras proteínas para regular su degradación.

1.3.1.1. Vía genómica canónica del AHR

Se le llama vía genómica canónica dado que es la ruta clásica por la que el AHR controla la expresión de genes mediante la unión a secuencias tipo XREs. En esta ruta el AHR se mantiene en estado inactivo en el citoplasma hasta la interacción con un agonista. El AHR citoplásmico forma un complejo multiproteico que consiste de un dímero de HSP90, XAP2 (también conocida como AIP), la co-chaperona p23 y la protein cinasa SRC. Una de las moléculas HSP90 se une a la región PAS del AHR, mientras que la segunda HSP90 interactúa con la región b-HLH y la región PAS. XAP2 estabiliza el complejo de chaperonas del AHR por medio de la unión directa con HSP90 y el AHR. XAP2 también está involucrada en el plegamiento y la estabilización del AHR, promoviendo su localización citoplasmática a través de inhibir la interacción del complejo AHR-chaperonas con las importinas- β en la membrana nuclear, las cuales median el importe del AHR al núcleo. La proteína p23 protege al AHR de la degradación mediada por ubiquitina y también promueve la localización citoplasmática del AHR. Por su parte, SRC está involucrada en los pasos iniciales de la activación del AHR una vez que se une a su ligando y también participa en mecanismos de señalización no canónicos del AHR (18).

Una vez que un agonista se une al AHR, XAP2 se disocia del complejo, resultando en la exposición de la SLN en la región amino terminal del AHR y una señal de exporte nuclear adyacente a la SLN. El AHR se transloca al núcleo por medio de un transporte dependiente de importina- β . La interacción AHR/importina- β es bloqueada por la fosforilación de sitios blanco de protein cinasas en el AHR, lo que inhibe su transporte nuclear como parte de un mecanismo regulatorio. Una vez en el núcleo, el complejo AHR-ligando se une al ARNT y el heterodímero es reclutado a motivos de unión consenso del ADN que presentan la secuencia 5'-TNGCGTG-3', llamados XREs. El represor del AHR (AHRR) compite con el complejo AHR-ligando por su interacción con ARNT, limitando la disponibilidad del ARNT para la unión con el AHR-ligando y consecuentemente provee un mecanismo regulador negativo de la expresión génica dirigida por el mismo AHR (18).

1.3.1.2. Vía genómica no canónica del AHR

Se le llama vía genómica no canónica dado que es una ruta no clásica donde el AHR controla la expresión de genes mediante la unión a motivos de ADN diferentes a los XREs. En esta ruta el AHR también puede interactuar con otros factores de transcripción (18). Se ha observado que el complejo AHR- ligando interactúa con otros factores de transcripción tales como el receptor de estrógenos (ER), el receptor de ácido retinoico (RAR), la proteína de retinoblastoma (RB) y el factor 6 tipo Krüppel (KLF6) (18, 33-36). En el caso del ER, RAR y RB se sabe que al formar heterodímeros con el AHR, estos complejos reconocen elementos de respuesta del ADN clásicos del receptor con el que el AHR está interactuando; por ejemplo, el complejo AHR-ER reconoce elementos de respuesta al o-estrógeno en el ADN (18). Por otro lado, en el caso del heterodímero AHR-KLF6 se ha reportado que las secuencias de reconocimiento en los promotores génicos son otras diferentes a los XREs y a las que reconoce sólo KLF6 (18).

Otras vías de regulación genómicas no canónicas mediadas por el AHR son a través de la interacción con reguladores epigenéticos y de la transcripción. Ejemplo de ello es la interacción del AHR con el factor de elongación de la transcripción positivo (P-TEFb), el complejo mediador, el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF y el activador de la transcripción BRG1 (18, 37-40). También el AHR modula la remodelación de la cromatina mediante el control de la metilación y acetilación de histonas, aunque el mecanismo específico no ha sido completamente dilucidado (18). Los mecanismos epigenéticos por los que el AHR regula la expresión génica incluyen el control de ARNs largos no codificantes, micro ARNs, retrotransposones, entre otros (18) .

1.3.1.3. Vías no genómicas del AHR

Se ha reportado que el AHR también puede actuar como una E3 ligasa y regular la degradación de otros FT y por lo tanto regular indirectamente los genes que esos FT regulan (41, 42). Como ejemplo de estos mecanismos de regulación ejercidos por el AHR, se encuentra su unión a CUL4B que marca al ER para su degradación

proteosomal. Otras proteínas cuya vida media es regulada por el AHR son p53, MYC, FOS, OCT4 y HIF1 α (41-44). Es importante destacar que la función de E3 ligasa del AHR compite con la función como FT y esto depende de la disponibilidad y función de ARNT. Es decir, los niveles de ARNT determinan si el AHR actúa por la vía transcripcional o por la vía de la actividad E3 ligasa (18). El AHR también controla indirectamente la actividad de NF- κ B a través de interactuar físicamente con RELA y RELB lo que resulta en la modulación de la activación de macrófagos (18, 45).

Adicionalmente, una vez que el AHR se activa, transloca al núcleo y se disocia del complejo de chaperonas, se pueden activar otras vías de señalización mediadas por las proteínas de este complejo citoplasmático (18). Por ejemplo, se sabe que la activación del AHR promueve la liberación de la forma activa de la proteína cinasa SRC, lo que lleva a la fosforilación una gran variedad de proteínas incluyendo la indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1), el inmunomodulador STAT3, la ubiquitin E3 ligasa c-CBL así como miembros de rutas del ácido araquidónico y del leucotrieno (18, 45).

1.3.2. Ligandos del AHR

El AHR desempeña múltiples funciones celulares endógenas en procesos relacionados con la defensa del organismo, homeostasis de tejidos, así como condiciones patológicas relacionadas con desórdenes inflamatorios y neoplásicos (18). Estas funciones las lleva a cabo al unirse a una variedad de ligandos exógenos y endógenos.

La principal fuente de exposición a estas sustancias para animales y humanos proviene de contaminantes ambientales, así como de metabolitos derivados de la dieta, de las células y de la microbiota. Además de los carcinógenos ambientales inicialmente identificados, como el TCDD y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, se han identificado otras fuentes de ligandos que activan al AHR con potencial farmacéutico, incluidos ingredientes dietéticos como los metabolitos del triptófano (Trp) y productos naturales como los flavonoides (19).

Es importante destacar que entre los ligandos del AHR, algunos pueden actuar como agonistas (activadores) o como antagonistas (inhibidores) del receptor para regular a sus genes blanco. Los más potentes antagonistas incluyen a la 3-metoxi-4-nitroflavona (MNF), la 6,2,4-trimetoxiflavona (TNF), y la 1-metil-N-[2-metil-4-[2-(2-metilfenil)diazenil]fenil-1H-pirazol-5-carboxamida (CH223191). Este último se considera como un antagonista puro y potente de AHR, que no exhibe actividades agonistas y que se une competitivamente al receptor, inhibiendo así su transactivación (46).

La dieta, el microbioma y el metabolismo del huésped proporcionan múltiples agonistas del AHR que probablemente participan en procesos que afectan a los tejidos donde se generan, así como a tejidos anatómicamente distantes, como el SNC (16, 18, 19, 47-49). Entre los principales agonistas endógenos del AHR se encuentran los derivados del metabolismo del Trp. Estos metabolitos pueden unirse y activar el AHR e incluyen a la quinurenina, el ácido quinurénico, el ácido xanturénico y el ácido cinabarinico (19). El 6-formilindol[3,2-b] carbazol (FICZ), un producto de fotooxidación del Trp formado en la piel por la exposición a la radiación ultravioleta (UV) o visible, tiene una alta afinidad por el AHR e induce la expresión del *CYP1A1* (50). Otro ligando endógeno putativo del AHR es el 2-(1' H-indol-3'-carbonil)-tiazol-4-carboxílico metil éster (ITE), este se ha propuesto que se forma de la condensación del Trp y la cisteína, aunque las enzimas involucradas en esta reacción se desconocen (18, 51). De manera similar, los vegetales en la dieta son una fuente de ligandos agonistas del AHR, tales como el indol-3-acetonitrilo, indol-3-carbinol y 3,3'-diindolilmetano (18). Además, metabolitos generados por la microbiota comensal también poseen actividad agonista del AHR, estos incluyen al ácido indol-3-acético, el indol-3-acetaldehído, el indol-3-aldehído, la triptamina y el 3-metilindol (18).

1.4. La Parkina como blanco potencial del AHR

Algunos estudios han reportado que varios compuestos pueden activar mecanismos que llevan a la inducción de la expresión de la Parkina, entre estos compuestos están el benzo[a]pireno, la 1,4-benzoquinona, la aflatoxina B1 y la dopamina (52-

55). Es interesante notar, que estos compuestos también son agonistas del AHR; sin embargo, en ninguno de estos trabajos se estudió la relación entre la señalización del AHR y la inducción de la Parkina. Es importante mencionar que cuando se han empleado agentes exógenos para inducir a la Parkina, en la mayoría de los casos, la inducción ocurre como una respuesta regulatoria adaptativa al daño celular causado por los mismos compuestos (6). Por lo tanto, las vías que induzcan la expresión de la Parkina con una neurotoxicidad mínima podrían tener un mayor potencial terapéutico.

El análisis de los promotores de *Prkn* en ratones y en *Drosophila melanogaster* ha revelado la presencia de múltiples elementos de respuesta del AHR, lo que sugiere que la expresión de la Parkina mediada por este factor de transcripción (FT) podría ser un proceso conservado entre especies (15, 56). Aunado a esto, la base de datos “The Human Protein Atlas” muestra que los niveles de expresión de proteína del AHR correlacionan con los niveles de expresión de la proteína de Parkina en varias regiones del cerebro, incluyendo el ganglio basal, la formación del hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo (57). Estas evidencias respaldan la idea de que la Parkina podría funcionar como un efector de la vía de señalización del AHR en las células neurales humanas.

Dada la evidencia que sugiere que *PRKN* es un gen blanco del AHR y a la capacidad de diferentes ligandos para activar la señalización del AHR, este estudio tiene como objetivo caracterizar el mecanismo molecular de la expresión de la Parkina humana en células de neuroblastoma SH-SY5Y utilizando dos agonistas distintos del AHR: el ligando exógeno y prototípico del AHR, el TCDD, y el principal ligando endógeno del AHR, la quinurenina.

2. Justificación

El AHR es un factor de transcripción que actúa como un sensor ambiental activando rutas de señalización que permiten a la célula adaptarse a distintas condiciones. Se han identificado múltiples genes que son blancos del AHR, los cuales están involucrados en distintos procesos biológicos, tales como el desarrollo neuronal, respuesta inmune y el cáncer. Recientemente, se identificó a *Prkn* como uno de los genes blanco del AHR en el mesencéfalo ventral de ratón. *PRKN* es el gen que codifica para la Parkina, una ubiquitin-ligasa necesaria para preservar el correcto funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas y evitar la muerte neuronal. Además, se ha observado que la Parkina puede tener un papel como supresor de tumores en tejidos no neuronales. Dada la importancia de la Parkina en estos procesos, y considerando la posibilidad de que podría ser un blanco potencial del AHR en el humano, es importante identificar si los efectos observados en el mesencéfalo ventral de ratón son compartidos en el humano. Además, es importante investigar el mecanismo por el cual el AHR regula a la Parkina humana. Este análisis sentará las bases para identificar a aquellos ligandos que activan al AHR y que sean capaces de inducir a la Parkina, lo que podría tener implicaciones en la supervivencia neuronal y de supresión de tumores.

3. Hipótesis

El TCDD y la quinurenina inducirán la expresión de la Parkina en células de neuroblastoma (NB) humano a través de la señalización mediada por el AHR.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Caracterizar el mecanismo molecular por el cual el AHR regula la expresión de *PRKN* en células de NB humano SH-SY5Y.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Caracterizar al promotor del gen *PRKN* mediante un análisis *in silico*.
- 4.2.2. Identificar la activación e inhibición de la ruta genómica del AHR (activada e inactivada con TCDD y CH223191, respectivamente) mediante su localización subcelular por inmunofluorescencia.
- 4.2.3. Evaluar la funcionalidad transcripcional del AHR en células SH-SY5Y mediante la inducción de ARNm de *CYP1A1*.
- 4.2.4. Evaluar el efecto de la activación del AHR con TCDD y quinurenina sobre la expresión de ARNm de *PRKN*.
- 4.2.5. Evaluar el efecto de la activación del AHR con TCDD y quinurenina sobre los niveles de proteína de Parkina.
- 4.2.6. Evaluar si la inducción de ARNm y proteína de Parkina es dependiente de la activación transcripcional del AHR mediante el tratamiento con el antagonista CH223191.
- 4.2.7. Determinar el efecto del TCDD y la quinurenina sobre la transactivación del promotor del gen *PRKN*.
- 4.2.8. Evaluar la importancia del sitio de unión conservado del AHR XRE2, localizado en el promotor de *PRKN*, en la transactivación génica mediada por el TCDD y la quinurenina.
- 4.2.9. Evaluar la posible interacción del AHR activado con TCDD y quinurenina con el promotor del gen *PRKN* mediante ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

5. Materiales y métodos

5.1. Cultivo celular

La línea celular de NB humano SH-SY5Y se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2266). Esta línea celular es una sublínea clonada tres veces de la línea celular de NB SK-N-SH (ATCC, HTB-11), originada de un tumor metastásico de hueso. La elección de las células SH-SY5Y como nuestra línea celular modelo se basa en su origen humano y en sus características neuronales, los cuales proporcionan observaciones biológicamente relevantes sobre la función del sistema nervioso y las respuestas a compuestos en células humanas (58). Además, en comparación con otras células de NB, se sabe que las SH-SY5Y expresan niveles basales de Parkina, lo que permite la detección de inducciones desde leves hasta robustas (59). Es importante destacar que otro criterio de selección fue la falta de expresión del proto-oncogen *MYCN* en las células SH-SY5Y, asegurando que los niveles de expresión de AHR y Parkina no se vean afectados por este FT, según lo observado en estudios previos (59, 60).

Las células fueron mantenidas en el medio de cultivo "Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12" (DMEM F12, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Byproducts) y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco/Invitrogen) y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂. Las células (pase 8-12) se subcultivaron cada 3-5 días usando 0.05% de tripsina-EDTA (Gibco/Invitrogen) y sembradas a una densidad celular de 1x10⁶ en placas de 6 pozos 24 horas previas a los experimentos. Para investigar el impacto de la señalización transcripcional del AHR se realizaron tratamientos con los agonistas del AHR TCDD (Accustandard), quinurenina (L-kynurenine, Sigma-Aldrich), FICZ (ENZO, Life Sciences) e ITE (TOCRIS), así como con el antagonista del AHR CH223191 (Sigma-Aldrich). En todos los ensayos se utilizaron como controles de dimetilsulfóxido (DMSO, 0.02% v/v) para los tratamientos con TCDD, FICZ, ITE y CH223191, así como (HCl 0.2 mM) para los tratamientos con quinurenina.

5.2. Condiciones de tratamientos: ensayo de MTT

Para determinar las condiciones de tratamiento, se evaluó la viabilidad (actividad metabólica) de las células SH-SY5Y a través de ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). En resumen, se sembraron 1×10^5 células en 400 mL de medio DMEM-F12 en placas de 96 pozos, se dejaron a las células adherir a la placa de cultivo por 16 horas. Basándonos en rangos de concentración reportados en la literatura, las células fueron expuestas a varias concentraciones de TCDD (5, 10, 20 y 40 nM), quinurenina (50, 100, 200 y 400 μ M), CH223191 (1, 5, 10 y 20 μ M), FICZ (5, 10, 20 y 40 nM) e ITE (1, 5, 10 y 20 μ M) y se incubaron durante 20 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Después de la incubación, se agregaron 10 μ L de solución de MTT (5 mg/mL en solución salina de fosfatos, PBS) a los cultivos celulares y se completó la incubación por 4 horas más (para completar 24 horas de tratamiento). Posteriormente, los sobrenadantes se reemplazaron por 100 μ L de DMSO, se mezclaron por rotación suave y se midió la absorbancia a 570 y 620 nm. Para calcular la viabilidad celular, se utilizó la diferencia entre la absorbancia a 570 y 620 nm de todas las muestras incluyendo el vehículo. Cada valor se normalizó con respecto al promedio de absorbancia del vehículo (100% de señal) y la viabilidad celular se representó como porcentaje. Bajo estas condiciones se seleccionaron las concentraciones de los tratamientos a 10 nM de TCDD, 100 μ M de quinurenina y 10 μ M de CH223191 para los experimentos subsecuentes (Figura 4). Los agonistas FICZ (10 nM) e ITE (10 μ M) sólo fueron considerados para lo evaluación de la expresión de ARNm de *PRKN* en células SH-SY5Y.

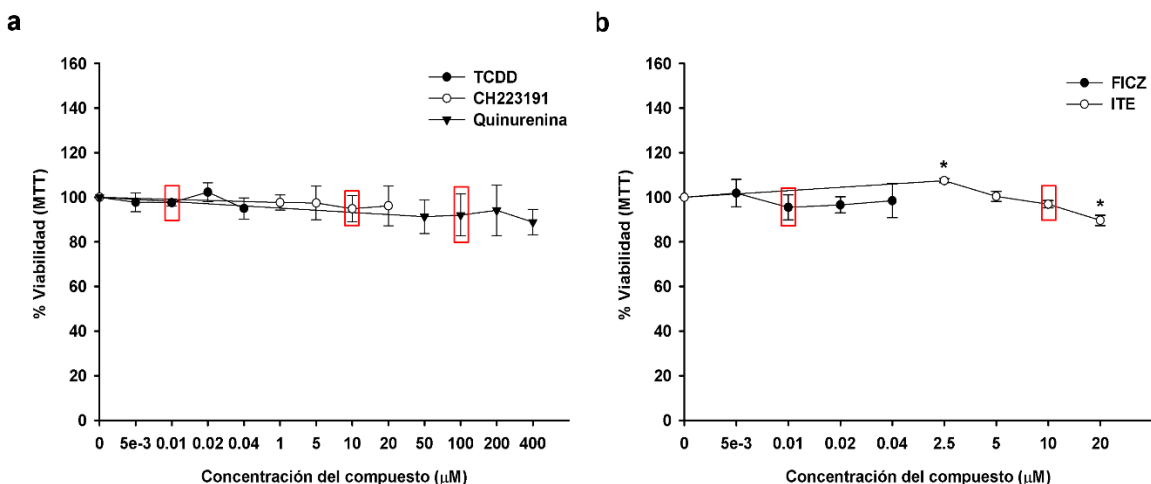


Figura 4. Ensayos de MTT. Las células SH-SY5Y fueron tratadas durante 24 horas con a) TCDD (5, 10, 20 y 40 nM), quinurenina (50, 100, 200 y 400 μM) y CH223191 (1, 5, 10, 20 y 40 μM) o con b) FICZ (5, 10, 20 y 40 nM) e ITE (1, 5, 10, 20 μM) previo a la evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Las absorbancias de las células tratadas con los diferentes compuestos se compararon con la absorbancia de las células tratadas con los vehículos controles correspondientes (DMSO 0.02 % para TCDD, CH223191, FICZ e ITE; y 0.2 mM HCl para quinurenina). La gráfica muestra el promedio ± desviación estándar del porcentaje de viabilidad de las células con tratamientos normalizadas con el 100% de la viabilidad de los controles. Los rectángulos rojos señalan las concentraciones de trabajo seleccionadas para futuros experimentos. Se realizaron tres experimentos independientes y los resultados se analizaron mediante ANOVA post-hoc Boferroni * $p < 0.05$.

5.3. Análisis *in silico* del promotor del gen *PRKN*

Se analizó una sección que comprende 600 pares de bases (pb) de la región promotora del gen *PRKN*, la cual se extiende desde -500 pb hasta +100 pb, respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés). La secuencia nucleotídica se obtuvo de la base de datos de Eukariotic Promoter Data Base (EPD) (61) que enlaza sus datos a GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el número de acceso NC_000006.12. Para identificar los sitios de unión de factores de transcripción (SUFT) se utilizó el software ALGGEN-PROMO (62). La búsqueda de SUFT dentro del promotor del gen *PRKN* se llevó a cabo con un corte de 95% como tasa de similitud mínima entre la matriz de unión de los FT y las secuencias

encontradas en el promotor del gen *PRKN*. Para presentar la esquematización de los SUFT (anotación de secuencia) se utilizó el software SnapGene viewer (www.snapgene.com).

5.4. Homología de secuencias de los XREs en el promotor del gen *PRKN* en diferentes especies

Se realizó un análisis de homología de secuencias de los sitios de unión del AHR:ARNT (XRE1 y XRE2) encontrados en el promotor del gen *PRKN* humano y 41 especies diferentes de vertebrados. Para el alineamiento múltiple de secuencias se utilizó la herramienta del Instituto de Bioinformática Europeo (EBI) CLUSTAL Omega, versión 1.2.4 (63). Las secuencias de las regiones promotoras de las especies analizadas se obtuvieron de la base de datos EPD (61) que contiene datos enlazados al UCSC Genome Browser (64).

5.5. Redes de interacción de FTs que regulan a *PRKN*

El análisis de redes de interacción de los FT que regulan la expresión de *PRKN* se llevó a cabo usando los servidores STRING y GeneMANIA (65, 66). STRING calcula las conexiones proteína–proteína utilizando asociaciones funcionales respaldadas por evidencia científica. STRING lleva a cabo evaluaciones, cuantificaciones y comparaciones de todas las asociaciones entre las proteínas incluidas en el análisis, contrastándolas con la participación común en los mapas de vías de KEGG. A las asociaciones resultantes se les asigna un “puntaje de confianza” de STRING que varía de 0 a 1, correspondiendo a la probabilidad estimada de que la asociación sea verdadera (66). Una vez seleccionado el o los FT más asociados a AHR:ARNT (resultantes de STRING) se realizó un análisis de redes de interacción génica utilizando GeneMANIA. GeneMANIA asigna pesos (puntajes mayores a 0) para indicar el valor predictivo de cada conjunto de datos seleccionado para la consulta. Estos pesos se asignan a las redes según su importancia para los genes de la consulta. Las redes que no son relevantes reciben un peso de 0 y no se incluyen en los resultados. Los algoritmos de ponderación de redes utilizados por GeneMANIA han sido validados en estudios anteriores (65).

5.6. Evaluación de los niveles de ARNm de *CYP1A1*, *PRKN* y *ATF4*

5.6.1. Extracción de ARN total

Para los tratamientos de las células SH-SY5Y se establecieron curvas de tiempo de 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 24 horas tanto para TCDD 10 nM como para quinurenina 100 μ M; se utilizó el mismo esquema de tratamientos utilizando los vehículos controles DMSO 0.02% y HCl 0.2 mM. Para la evaluación de la participación del AHR en los efectos del TCDD o de la quinurenina, se realizó un pre-tratamiento con CH223191 10 μ M durante 1 hora, posteriormente se agregó TCDD (10 nM) o quinurenina (100 μ M) durante 24 horas. Para comparar el efecto de diferentes ligandos sobre los niveles de ARNm de *PRKN*, se realizaron tratamientos de las células SH-SY5Y con TCDD (10 nM), FICZ (10 nM), ITE (10 μ M) y quinurenina (100 μ M) por 24 horas. El ARN total fue aislado de las células SH-SY5Y utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Este método de extracción de ARN está basado en la separación de componentes orgánicos y acuosos celulares mediante una solución acidificada con isotiocianato de guanidina y fenol. Después de los tratamientos, las células (1×10^6 células) fueron lavadas con PBS y se les añadió 1 mL de TRIzol®, se incubaron por 3 minutos y se homogenizaron antes de transferir a tubos eppendorf. Los lisados se almacenaron a -70 °C hasta su uso o se extrajo el ARN inmediatamente. La separación de las fases acuosa y orgánica se realizó agregando 200 μ L de cloroformo, se agitó en vortex por 10 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, las muestras se centrifugaron a 13,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación se transfirió la fase acuosa (fase superior) a un tubo limpio y se añadieron 500 μ L de alcohol isopropílico. Se agitó suavemente por 1 minuto y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 13,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Seguido de la centrifugación, se observó una pastilla de ARN, se removió el sobrenadante sin tocar la pastilla y se realizaron 2 lavados con 1 mL de etanol al 70% centrifugando a 7,500 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, la pastilla se disolvió en 20 μ L de agua libre de ARNasas. La pureza y concentración del ARN se determinaron espectrofotométricamente

midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm con un NanoDrop (Thermo Scientific). La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis (100 V durante 30 minutos) en geles de agarosa al 1%, la visualización de las bandas se realizó mediante bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) añadido a la preparación del gel de agarosa. Las bandas prominentes del ARN ribosomal 28S y 18S se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

5.6.2. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cADN, se retro-transcribieron 1 μg de ARN total utilizando la transcriptasa inversa (RT SuperScript II, Invitrogen) y oligonucleótidos aleatorios. A cada muestra de ARN total se le añadió 1 μL (250 $\text{ng}/\mu\text{L}$) de oligonucleótidos aleatorios y se ajustó el volumen a 13.5 μL . La mezcla se calentó por 5 minutos a 65 $^{\circ}\text{C}$ y enseguida se colocó en hielo durante 2 minutos. A la mezcla se le adicionaron 4 μL de buffer 5X, 2 μL de DTT 0.1 M, 1 μL de dNTPs (10 mM) y 0.5 μL (100 unidades) de la RT SuperScript II. Se mezcló por pipeteo y se incubó durante 40 minutos a 50 $^{\circ}\text{C}$. Terminada la reacción se mantuvo a 4 $^{\circ}\text{C}$ antes de su almacenamiento a -70 $^{\circ}\text{C}$.

5.6.3. PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó con el sistema TaqMan® en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) y los resultados se analizaron utilizando el método del ciclo umbral (CT) comparativo (67). Se utilizaron sondas TaqMan® (Applied Biosystems) específicas para los genes blanco, incluyendo *PRKN* (Hs01038322_m1), *CYP1A1* (Hs02382618_s1), *ATF4* (Hs00909569_g1), y el gen de referencia *HPRT* (Hs99999909_m1) para la amplificación. La mezcla de PCR consistió en 1 μL de cADN, 7.5 μL (1x) de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), y 0.4 μL (0.9 μM y 0.25 μM) de cebadores y sondas TaqMan®. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo bajo el protocolo de amplificación de la Tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de amplificación de ARNm de los genes de interés mediante qPCR.

Parámetros para la qPCR en el equipo StepOne™		
50 °C	2 minutos	1 ciclo
95 °C	10 minutos	
95 °C	15 segundos	40 ciclos
60 °C	1 minuto	

5.7. Evaluación de la localización subcelular del AHR por medio de inmunofluorescencia

La localización celular del AHR en las células SH-SY5Y tratadas con TCDD y pre-tratadas con CH223191 fue evaluada mediante tinción de inmunofluorescencia. Las células (8×10^4) fueron sembradas e incubadas con vehículo DMSO (0.02%) o TCDD (10 nM) durante 1 hora, o preincubadas con CH223191 (10 μ M) por 1 hora seguido del tratamiento con TCDD (10 nM) por 1 hora adicional. Después del tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Las células fueron lavadas tres veces con PBS y permeabilizadas con Triton X-100 al 0.2% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear la unión no específica, las células fueron incubadas con 5% de albúmina sérica bovina (BSA) y Triton X-100 al 0.05% en PBS durante 2 horas. A continuación, las células fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario contra AHR (dilución 1:200, MA1–513, Invitrogen) en una solución que contiene 3% de BSA y Triton X-100 al 0.05% en PBS. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las células fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-conejo IgG (dilución 1:200, ab150077, Abcam) en PBS que contiene Triton X-100 al 0.05%. Para visualizar los núcleos celulares, las células fueron co-teñidas con Vectashield DAPI (H-1200, Vector Laboratories). Las células se analizaron mediante microscopía confocal utilizando

un microscopio confocal de barrido láser (Leica TCS-SPE) con un objetivo de 40x en modo XYZ (Z-stacks). Se adquirieron Z-stacks que consisten en 3-4 cortes ópticos, y se generaron imágenes de proyección tridimensional utilizando el software Leica LAS AF lite.

5.8. Evaluación de los niveles de proteína de Parkina, CYP1A1, ATF4, GRP78 y β -actina

5.8.1. Extracción de proteínas totales de cultivos celulares

Para los tratamientos de las células SH-SY5Y se establecieron curvas de tiempo de 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 24 horas tanto para TCDD 10 nM como para quinurenina 100 μ M; se utilizó el mismo esquema de tratamientos utilizando los vehículos controles DMSO 0.02% y HCl 0.2 mM. Para la evaluación de participación del AHR en los efectos del TCDD o de la quinurenina, se realizó un pre-tratamiento con CH223191 10 μ M durante 1 hora, posteriormente se agregó TCDD (10 nM) o quinurenina (100 μ M) durante 1 y 8 horas, para evaluar efectos sobre ATF4 y Parkina, respectivamente. Finalizados los tratamientos, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron utilizando 100 μ L de tampón de lisis que contenía 50 mM de HEPES, 0.5 M de NaCl, 1.5 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100 e inhibidor de proteasas Mini Complete (1 tableta/10 mL, Roche). Las células se rasparon con un gendarme y se pasaron a tubos eppendorf de 1.5 mL para sonicarlas. Se realizaron 3 rondas de sonicación en hielo con un sonicador (100-watt Ultrasonic Processor Cole-Parmer) a una amplitud de 40 watts, con pulsos continuos de 10 segundos y descansos de 1 minuto. Posteriormente, los tubos se agitaron en vórtex a 4 °C durante 30 minutos y se centrifugaron a 12,000 r.p.m. por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se aisló y se realizaron alícuotas que se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

5.8.2. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad). En una placa de 96 pozos, se prepararon por triplicado diluciones de BSA (1

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a concentraciones finales de 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1562 y 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (blanco), en un volumen total de 160 μL de solución diluyente (preparada con 1 μL de búfer de lisis de proteínas por cada 159 μL de agua miliQ). Además, los extractos de proteínas se evaluaron por triplicado en una dilución que contenía 1 μL del extracto proteínico y 159 μL de la solución diluyente. Una vez preparadas todas las muestras se añadió a cada pozo 40 μL del reactivo de Bradford, se mezclaron con una pipeta y se leyeron inmediatamente a una longitud de onda de 595 nm en fotómetro para microplacas Multiskan FC. Las concentraciones de proteínas de las muestras se calcularon promediando las absorbancias de cada triplicado, restando el promedio de la absorbancia del blanco (solución diluyente) y finalmente utilizando la ecuación de la recta resultante de la curva de BSA ($R^2 > 0.95$).

5.8.3. Western Blot

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Previo a la electroforesis, 40 μg de proteína total se mezclaron con 8% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 20% de glicerol, 2% de β -mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol, se hirvieron por 5 minutos y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE), a un voltaje de 80 V durante 0.5 horas y 100 V durante 2.5 horas. La electroforesis se llevó a cabo en un buffer que contenía Tris-HCl 30.2 mM, glicina 144 mM (pH 8.3) y SDS al 10%. Después, las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa utilizando un Mini Trans-Blot (Bio-Rad) usando un buffer que contenía 48 mM Tris-HCl, 39 mM glicina (pH 8.3) y metanol al 20%. Las membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente en presencia de leche descremada al 5% y BSA al 0.5% en un tampón de bloqueo (25 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM de NaCl). Posteriormente, las membranas se incubaron a 4 °C durante 16 horas con anticuerpos primarios contra Parkina (1:200, sc-32282), β -actina (1:4000, sc-47778), ATF4 (1:500, sc-390063), GRP78 (1:500, sc-13539) (Santa Cruz Biotechnology) o CYP1A1 (1:1000, MBS127670, MyBioSource), diluidos en un búfer que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.1%, leche descremada al 0.5% y BSA al 0.05%. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-

Tween 0.1% y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP): anti-IgG de ratón (PI-2000, Vector Laboratories) y anti-IgG de conejo (ab6741, Abcam) durante 2 horas a 4 °C. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween 0.1% y las proteínas inmunorreactivas se detectaron utilizando un kit de detección de western blotting con quimioluminiscencia mejorada (Millipore). La densidad óptica integrada de las bandas se cuantificó mediante densitometría utilizando el software Image Studio Lite (LI-COR Biosciences). Cada proteína objetivo analizada se normalizó al estándar interno β -actina para eliminar cualquier variabilidad de línea base.

5.9. Ensayos de transactivación del promotor del gen *PRKN*

5.9.1. Clonación del promotor del gen *PRKN* en el vector reportero de luciferasa

Para generar construcciones de reporteros de luciferasa, se realizó una amplificación la región promotora del gen *PRKN* humano mediante PCR, utilizando como plantilla ADN genómico de células de sangre periférica humana. Se diseñaron cebadores para PCR con sitios de restricción. Se utilizó el cebador Forward-KpnI (5'- CCGGTACCCCTATAAGGCCCTTTGCTGAGTGG-3') y el cebador Reverse-XhoI (5'- CCGCTCGAGCGGAACTGGGTAAATCCTCCAGGC-3') para amplificar el promotor (-970/+15) de *PRKN* humano. El fragmento amplificado se clonó en vector reportero pGL4.10 [luc2] (Promega) dentro de los sitios de restricción KpnI y XhoI, posteriormente se ligó con T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific) dando como resultado el plásmido pGL4-*PRKN* (-970/+15). La orientación y el tamaño del amplicón insertado se confirmaron mediante digestiones simples y dobles con las enzimas de restricción KpnI y XhoI. Los productos digeridos se analizaron mediante electroforesis en gel para verificar la presencia de los fragmentos esperados. Además, se llevó a cabo una secuenciación de ADN para validar la secuencia correcta del fragmento insertado.

5.9.2. Ensayos de mutagénesis dirigida del sitio de unión XRE2

Los ensayos de mutagénesis dirigida se realizaron con el kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) con algunas modificaciones al protocolo establecido por el fabricante. Brevemente, se diseñaron oligonucleótidos dirigidos al sitio de unión del AHR más conservado dentro del promotor de *PRKN* humano, el XRE2. Los oligonucleótidos fueron: forward (FWD) 5'-CGCCCTCCGCGCGACCGCATTCTAGGG-3' y reverse (REV) 5'-CCCTAGGAATGCGGTCGCGCGGAGGGCG-3' que contienen dos mutaciones en los nucleótidos más conservadas (T y G) en el sitio de unión consenso del AHR:ARNT reportada en la base de datos de JASPAR con la matriz de unión MA0006.1. Para la reacción de mutagénesis mediante PCR se siguió la metodología propuesta por Edelheit et. al (68). Para ello, se realizaron dos reacciones de PCR separadas: una reacción contenía sólo el cebador FWD (concentración final 0.4 mM) y la otra sólo el cebador REV (concentración final 0.4 mM). En cada reacción se utilizaron 500 ng del plásmido parental pGL4-*PRKN* (-970/+15) que contiene el promotor de *PRKN* silvestre. Para la reacción, se utilizó la polimerasa Pfu ultra HF, dNTPs y amortiguador 10X proporcionado en el kit de mutagénesis. Estas reacciones se realizaron siguiendo la curva de amplificación de la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros para la PCR punto final para mutagénesis dirigida.

PCR punto final		
94 °C	2 minutos	1 ciclo
94 °C	40 segundos	
55 °C	40 segundos	30 ciclos
68 °C	5 minutos	

Una vez finalizadas las PCR separadas, se juntó el contenido en un solo tubo y se continuó con un proceso de desnaturalización y enfriamiento paulatino para permitir el realineamiento de las hebras complementarias (Tabla 3). Enseguida, a 50 μ L de reacción se le añadieron 30 U de la enzima de restricción DpnI y se incubó durante 16 horas a baño maría a 37 °C para permitir la degradación del plásmido parental no mutado. Posterior a la digestión, se tomaron 3 μ L de la reacción y se transformaron 50 μ L de bacterias XL1-gold competentes siguiendo las instrucciones indicadas en el kit de mutagénesis. Finalmente, las bacterias transformadas se sembraron en agar Luria-Bertani (LB) con ampicilina (100 μ g/mL) para permitir la selección de bacterias que contuvieran el plásmido. La presencia del inserto de interés se comprobó mediante una PCR dirigida a la región de interés (FWD 5'-GCCAGCTTGGTCCTCTT-3' y REV 5'-CAGGCCAGCAATCTTACGTC-3'), así como con secuenciación de ADN.

Tabla 3. Protocolo para el realineamiento del plásmido sometido a mutagénesis.

Desnaturalización y realineamiento del nuevo plásmido sintetizado	
95 °C	5 minutos
90 °C	1 minuto
80 °C	1 minuto
70 °C	30 segundos
60 °C	30 segundos
50 °C	30 segundos
40 °C	30 segundos
37 °C	Mantener hasta la digestión con DpnI

5.9.3. Transfección de células SH-SY5Y con los vectores pGL4-*PRKN* (-970/+15) y pGL4-*PRKN*-XRE2-MUT y ensayos de transactivación

Para realizar el ensayo de luciferasa, las células SH-SY5Y fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pGL4-*PRKN* (-970/+15) o pGL4-*PRKN*-XRE2-MUT utilizando el reactivo de transfección GeneXPlus (ATCC) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, un día antes de la transfección, las células fueron sembradas en una placa de 24 pozos a una densidad de 2×10^5 células/pozo (confluencia del 50% al 80%) en 500 μ L medio DMEM-F12 suplementado. El día de la transfección, el medio suplementado se cambió por medio DMEM-F12 sin antibiótico. Se diluyó 1 μ L del reactivo GeneXPlus con 50 μ L de medio Opti-MEM I reducido en suero y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A la dilución anterior se le añadió el plásmido reportero pGL4-*PRKN* (-970/+15) (0.5 μ g) y el plásmido pRL-CMV (0.05 μ g, control interno) o pGL4-*PRKN*-XRE2-MUT (0.5 μ g) y el plásmido pRL-CMV (0.05 μ g). La mezcla se incubó durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. La mezcla GeneXPlus/medio/ADN se añadió a 500 μ L de medio de cultivo en cada pocillo de la placa de 24 pozos que contenía células SH-SY5Y. Después de la transfección, las células se cultivaron durante 24 horas. Luego, se reemplazó el medio por uno fresco (completo), y las células se incubaron con vehículo DMSO (0.02%) o HCl (0.2 mM) durante 24 horas, o con TCDD (10 nM) o quinurenina (100 μ M) durante 6 y 24 horas.

Después del tratamiento, las células se lisaron y homogenizaron mediante incubación con un tampón de lisis pasiva (Promega) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La actividad de la luciferasa se determinó utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante, utilizando un luminómetro Modulus (Turner Biosystems). Los blancos se obtuvieron realizando ensayos de actividad de luciferasa en células transfectadas utilizando el vector pGL4-luc (vector vacío). Los niveles normalizados de actividad de la luciferasa de luciérnaga se obtuvieron comparando la actividad de la luciferasa de pGL4-*PRKN* (-970/+15), pGL4-*PRKN*-XRE2-MUT y pGL4-luc contra la actividad

de la luciferasa Renilla de pRL-CMV. Esta normalización tiene en cuenta las variaciones en la eficiencia de transfección y el número de células.

5.9.4. Evaluación de la unión del AHR al promotor del gen *PRKN* mediante el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Previo a la inmunoprecipitación, las células SH-SY5Y fueron tratadas con el vehículo DMSO (0.02%), TCDD 10 nM o quinurenina 100 μ M durante 1 hora. El ensayo de ChIP se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit A/G Plus agarose ChIP (Santa Cruz Biotechnology). En resumen, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y estéril, recolectadas y colocadas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Las células fueron resuspendidas en 300 μ L de PBS y se sometieron a un entrecruzamiento usando formaldehído al 1% durante 10 minutos a 4 °C con agitación constante. El entrecruzamiento se detuvo con glicina al 0.125 M durante 10 minutos a 4 °C, y las células fueron centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos a 4 °C. La pastilla celular se lavó con 200 μ L de PBS frío y estéril, se centrifugó en las mismas condiciones y se resuspendió en 1.5 mL de lisis celular. El lisado se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos a 4 °C, y la pastilla se recuperó como una fracción nuclear. La sonicación de la fracción nuclear se realizó en cuatro rondas pulsadas, cada una a 50 Watts de potencia, durante 30 segundos con un sonicador Cole Parmer Ultrasonic Processor (Vernon Hills). Bajo estas condiciones, se obtuvieron fragmentos de ADN con un tamaño promedio de 300-700 pb. Los extractos sonicados se evaluaron por espectrometría y se distribuyeron cantidades iguales de cromatina en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se pre-aclararon con 30 μ L de agarosa A/G Plus (Santa Cruz Biotechnology) durante 30 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante después de centrifugación a 21,000 x g y se incubó toda la noche a 4 °C con una mezcla de 1 μ g de anticuerpo monoclonal anti-AhR (RPT9) (MA1-513, Thermo Fisher Scientific) y anti-Receptor AhR (A-3) (sc-133088, Santa Cruz Biotechnology) para precipitar los complejos ADN-AHR. Se empleó un anticuerpo no específico de caballo anti-IgG de ratón (PI-2000, Vector Laboratories) como control negativo. Se añadió agarosa A/G Plus (Santa Cruz Biotechnology) y se realizó una incubación de 2 horas con rotación. Las perlas se centrifugaron a

13,000 x g durante 20 segundos y se lavaron dos veces con 0.3 mL de Buffer de Lisis Alta Sal, seguido por dos lavados con 0.3 mL de Buffer de Lavado, y finalmente, las perlas se resuspendieron en 0.3 mL de Buffer de Elución (Santa Cruz Biotechnology) y se realizó la reversión del enlace cruzado incubando los tubos en un baño de agua a 67 °C, mezclando ocasionalmente, durante 2 horas. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se recogió e incubó en el baño de agua a 67 °C durante la noche. Las muestras fueron tratadas con Proteinasa K a una concentración final de 20 µg/mL durante dos horas a 37 °C. El ADN se purificó utilizando un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). La fase acuosa se recuperó después de la centrifugación a 800 x g y se mezcló con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). La nueva fase acuosa se separó por centrifugación a 800 x g y se precipitó con tres volúmenes de etanol absoluto, lavando dos veces con etanol al 70%. Las pastillas se resuspendieron en 30 µL de agua libre de ADNasa/RNAasa. El ADN input se aisló siguiendo el mismo protocolo. El enriquecimiento del ADN en la región promotora del gen *PRKN*, que contiene posibles sitios de unión de AHR (-116 a -24 pb), se analizó mediante qPCR. Los cebadores FWD y REV utilizados fueron 5'-GGCAGGAGGCGTGAGGAGAA-3' y 5'-CGGCCCTAGGAATGCGCAC-3', respectivamente. Cuarenta microgramos de ADN de CHIP o de ADN input se mezclaron con 200 nM de cada cebador de PCR y 5 mL Master Mix KAPPA SYBR FAST qPCR (Sigma-Aldrich) en un volumen total de 10 µL. La qPCR se realizó utilizando un sistema de PCR en tiempo real Step One (Applied Biosystems). Las mezclas de reacción se incubaron a 95 °C durante 5 minutos, seguido de amplificación a 95 °C durante 10 segundos, unión a 65 °C durante 10 segundos y extensión a 72 °C durante 10 segundos, durante un total de 40 ciclos. Todos los experimentos se realizaron en triplicado y cada muestra se sometió a PCR por duplicado.

5.9.5. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar (DE) de al menos tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de pruebas post-hoc de Bonferroni, o bien *t* de Student, utilizando el software SigmaPlot 11.0. La significancia estadística se definió como $p < 0.05$.

6. Resultados

Estudios previos de nuestro grupo de investigación indican que el AHR activado por el TCDD induce los niveles de ARNm y proteína de Parkina en el mesencéfalo ventral de ratón. Considerando lo anterior, este estudio estuvo dirigido para averiguar si estos mecanismos son compartidos en células neurales humanas, así como caracterizar el mecanismo molecular por el cual el AHR regula al gen de *PRKN* cuando es activado por distintos ligandos.

Inicialmente, examinamos una región del promotor del gen *PRKN* que incluye 600 pb, desde -500 pb hasta +100 pb con respecto al sitio de inicio de transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) con el objetivo de identificar todos los SUFT que podrían ser clave para la regulación de la Parkina humana, incluyendo los XREs a los que se une el heterodímero AHR:ARNT. La figura 5 muestra los SUFT identificados en la región promotora de *PRKN* con al menos un 95% de similitud de secuencia con la matriz de unión de FT documentada en TRANSFAC (69). Los SUFT indicados con color verde son aquellos cuyos FT cuentan con evidencia previamente reportada, relacionada con la regulación positiva de la expresión de *PRKN*. Entre ellos, solamente el factor de transcripción activador 4 (ATF4), el factor de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB), HIF1 α , el factor de respiración nuclear 1 (NRF1) y la proteína tumoral p53, regulan directamente a *PRKN* mediante su unión al promotor. Los que se muestran en color azul son aquellos SUFT cuyos FT cuentan con evidencia previamente reportada sobre la represión de la expresión de *PRKN*. Adicionalmente, se identificaron dos XREs putativos (indicados por cuadros rojos) cercanos al TSS del promotor del gen *PRKN*, uno ubicado a -100 pb (XRE1) y el otro ubicado a -40 pb (XRE2).

No.	FT	Regulación	PMID	No.	FT	Regulación	PMID	No.	FT	Regulación	PMID	No.	FT	Regulación	PMID
1	AHR:ARNT	+	31404530	11	ER α			21	HIF1 α	+	36481701	31	STAT4		
2	AP-2			12	ETS1			22	MTF1			32	TBP		
3	ATF4	+	21113145	13	FOXA1	+	35464170	23	N-MYC	-	15078880	33	TFII-I		
4	c-Jun	-	30853892	14	FOXP3	-	35265221	24	NF1			34	THR β	-	34086893
5	CEBP α			15	GATA1			25	NFAT1			35	WT1		
6	CEBP β			16	GATA2			26	NRF1	+	31862413	36	YY1		
7	CREB	+	28366931	17	GATA3			27	p53	+	21930938				
8	E2F1			18	GCFC2			28	Pax-5						
9	E4F1			19	GR α	+	24669205	29	RXR- α						
10	ELK1	+	32938713	20	GR β	+	24669205	30	Sp1						

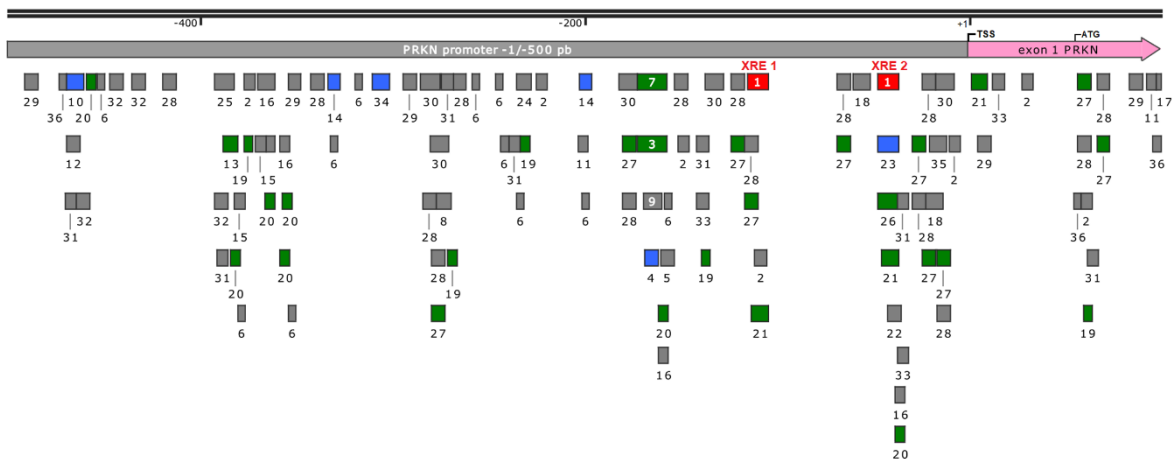


Figura 5. Análisis *in silico* de los SUFT en la región promotora del gen *PRKN* (-500 bp/+100 bp). La secuencia nucleotídica se obtuvo del sitio web de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando el número de acceso de GenBank NC_000006.12 que se expande desde 500 pb río arriba hasta 100 pb río abajo del TSS. La búsqueda de SUFT se realizó con el software ALGGEN-PROMO, estableciendo un 95% como tasa mínima de similitud en la matriz de unión del FT. La anotación de secuencia se realizó con el software SnapGene viewer. Los SUFT cuyos FT regulan positivamente a *PRKN* (basado en evidencia experimental) están representados por cuadros verdes, los FT represores de *PRKN* están representados por cuadros azules. Los cuadros grises indican FT para los que no se encontró evidencia relacionada a la regulación de *PRKN* y los cuadros rojos representan los SUFT del AHR:ARNT (XREs). La tabla superior muestra una lista de los FT identificados como reguladores del gen *PRKN*. La evidencia sobre la regulación está indicada por su respectivo PMID.

Con el objetivo de averiguar la importancia de los dos XRE identificados en el promotor del gen *PRKN*, realizamos un análisis de homología de secuencias. Para ello, se obtuvieron secuencias de promotores de 42 especies de vertebrados (incluyendo al humano) y se realizaron alineamientos múltiples de secuencias utilizando la herramienta CLUSTAL Omega, considerando como base las regiones

que corresponden al XRE1 y al XRE2 del promotor de *PRKN* humano (Figura 6). Las secuencias promotoras de las especies que alinean con el humano se obtuvieron de la base de datos EPD.

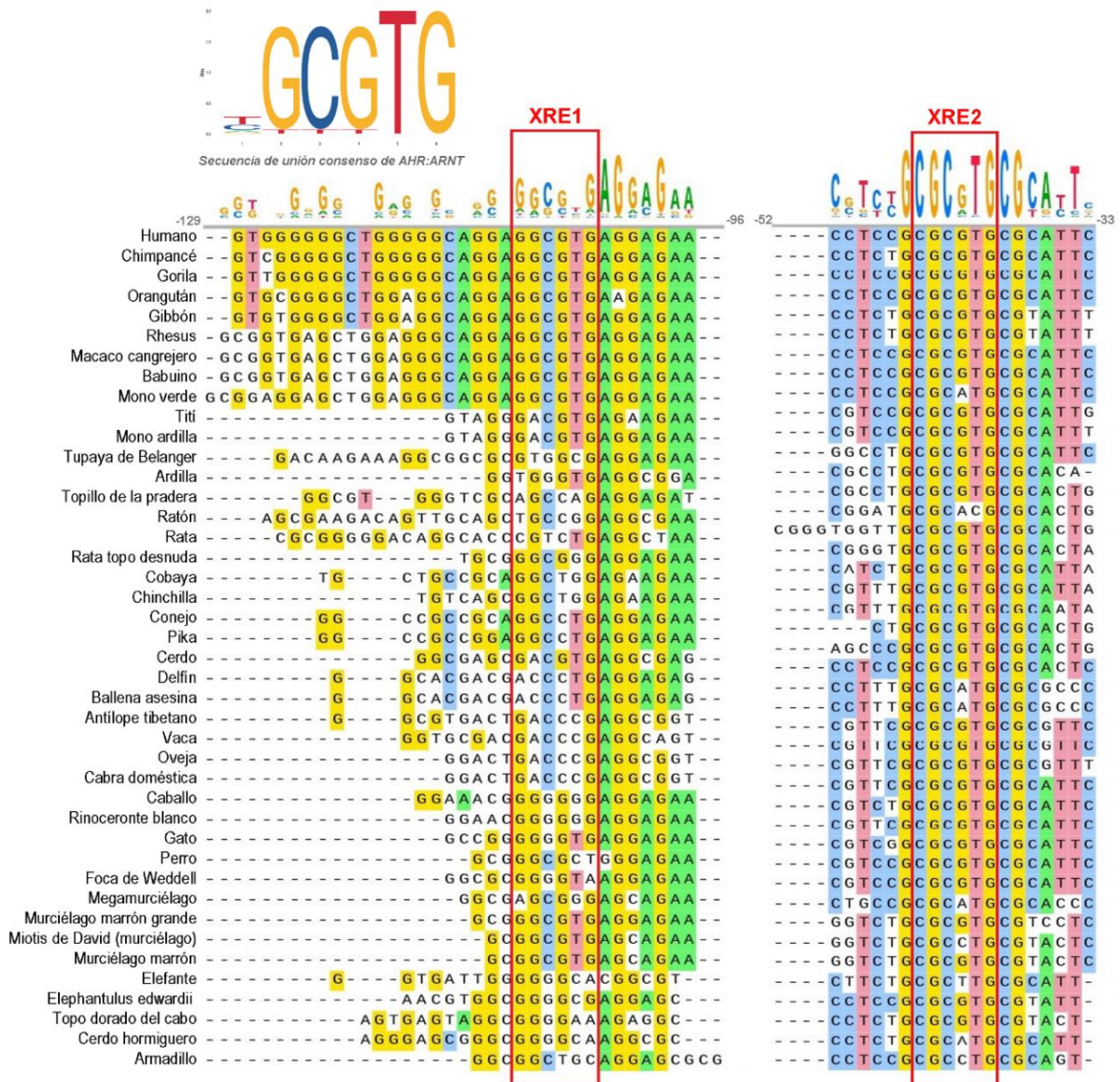


Figura 6. Análisis de homología de secuencias de los XREs identificados en el promotor del gen *PRKN*. Las regiones que incluyen el XRE1 y el XRE2 del promotor del gen *PRKN* humano se alinearon con las secuencias de 41 especies de vertebrados utilizando CLUSTAL Omega versión 1.2.4. Las regiones que corresponden a los XREs de AHR:ARNT se señalan en el recuadro rojo. En la parte superior izquierda se muestra la secuencia de unión consenso del AHR:ARNT (matriz de unión MA0006.1) reportada en la base de datos de JASPAR.

Como se observa en la figura 6, el XRE2 localizado a -40 pb del TSS se encuentra conservado en casi el 100% de las especies analizadas, lo que sugiere su potencial relevancia funcional en la regulación génica de *PRKN*. El XRE1 también muestra un alto grado de conservación, pero sólo en los primates. Además, de acuerdo a la secuencia de unión consenso del AHR:ARNT (imagen superior izquierda, Figura 6), las bases T y G finales son indispensables para la unión del heterodímero; esto se ve reflejado en la alta conservación de estos nucleótidos en ambos XREs de la gran mayoría de las especies analizadas.

Con el objetivo de investigar el impacto de la activación del AHR sobre la expresión de Parkina, verificamos que la vía genómica canónica del AHR se indujera *in vitro* en las células SH-SY5Y tratadas con TCDD. Estudios previos señalan que una vez que el agonista interactúa con el AHR este es activado y transloca al núcleo celular, con la consecuente inducción de la expresión de sus genes blanco, evento que se observa desde la primera hora de tratamiento (70-72). Considerando lo anterior, tratamos a las células SH-SY5Y con TCDD 10 nM durante una hora y evaluamos la translocación nuclear del AHR por medio de inmunofluorescencia y microscopía confocal. En la figura 7a se muestra que después de 1 hora de tratamiento con TCDD, el AHR citoplásmico se transloca hacia el núcleo celular, lo que es indicativo de su activación. Por el contrario, la pre-incubación con el antagonista del AHR CH223191, el cual se une al sitio de unión a ligando del receptor sin inducir su activación, bloquea la activación del AHR inducida por el TCDD. Estas observaciones nos indican que el AHR es capaz de activarse y translocar al núcleo en las células SH-SY5Y una vez que se une a un agonista como el TCDD.

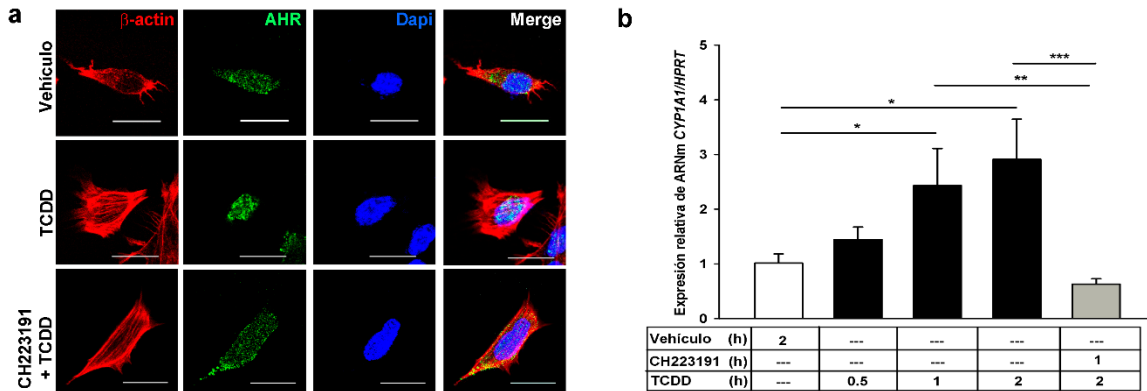


Figura 7. Evaluación de la funcionalidad transcripcional del AHR en células SH-SY5Y.

a) Efecto del tratamiento con el agonista TCDD y el antagonista CH223191 sobre la translocación nuclear del AHR en células SH-SY5Y. Las células fueron incubadas con el vehículo DMSO (0.02%) durante 1 hora, TCDD (10 nM) durante 1 hora, o pre-incubadas con CH223191 (10 μ M) durante 1 hora antes del tratamiento con TCDD (10 nM). Se realizó una inmunotinción con anticuerpos específicos contra AHR (verde) o β -actina (rojo) y una co-tinción con DAPI (azul) para detectar los núcleos. Barra de escala, 20 μ m. b) Evaluación de la inducción del ARNm de CYP1A1 como indicador de la activación transcripcional del AHR. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con el vehículo DMSO (0.02%) durante 2 horas, TCDD (10 nM) durante 0.5, 1 y 2 horas, o pre-incubadas con CH223191 (10 μ M) durante 1 hora antes del tratamiento con TCDD (10 nM). Los niveles de ARNm de CYP1A1 fueron determinados mediante RT-qPCR y normalizados al gen de referencia HPRT. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Para evaluar la significancia estadística se utilizaron pruebas ANOVA y post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Además, de la translocación nuclear, otro evento importante que es indicativo de la activación de la ruta genómica canónica del AHR, es la inducción de la expresión de sus genes blanco, como el *CYP1A1*, *CYP1B1* y *AHRR*, entre otros (72). Por lo tanto, evaluamos los niveles de expresión del ARNm de *CYP1A1* como biomarcador de la activación transcripcional mediada por el AHR. Como se muestra en la figura 7b, la inducción del ARNm de *CYP1A1* fue tiempo-dependiente después del tratamiento con TCDD. Esta inducción fue inhibida por el pre-tratamiento con CH223191, lo que indica que este antagonista puede bloquear la inducción de la expresión génica promovida por el TCDD. En conjunto, estos resultados indican que

el AHR es funcionalmente activo en las células de NB SH-SY5Y y que este modelo es adecuado para evaluar los efectos de la activación de la ruta genómica canónica del AHR.

Una vez confirmada la actividad transcripcional del AHR en las células SH-SY5Y, examinamos los efectos del TCDD sobre la expresión de la Parkina. Para ello, evaluamos los efectos de la activación transcripcional del AHR sobre los niveles del ARNm de *PRKN*. Como se observa en la figura 8a, el tratamiento con TCDD resultó en un incremento ligero y transitorio (1.5 veces) a las 2 horas de tratamiento. Los niveles de ARNm de *PRKN* fueron más persistentes después de 16 horas de tratamiento, manteniéndose hasta las 24 horas con un incremento cerca de 2.5 veces con respecto al control. Para dilucidar si dicha inducción era dependiente de la activación transcripcional del AHR, realizamos un pre-tratamiento con CH223191 antes de exponer a las células al TCDD. Como se muestra en la figura 8b, la regulación positiva de ARNm de *PRKN* fue dependiente de la activación del AHR, dado que el CH223191 bloqueó la inducción observada a las 24 horas.

Una vez establecidos los efectos del TCDD sobre la expresión de ARNm de *PRKN*, investigamos si el incremento observado en el ARNm se traducía en incrementos a nivel de proteína. Como se observa en la figura 8c, la activación del AHR con TCDD resulta en una sobreexpresión mantenida de la Parkina desde las 0.5 horas de tratamiento. Similar a los efectos sobre el ARNm de *PRKN*, la inducción de la expresión de Parkina a nivel proteico es dependiente de la activación transcripcional del AHR, dado que el tratamiento con CH223191 disminuye los efectos inducidos por TCDD (Figura 8d).

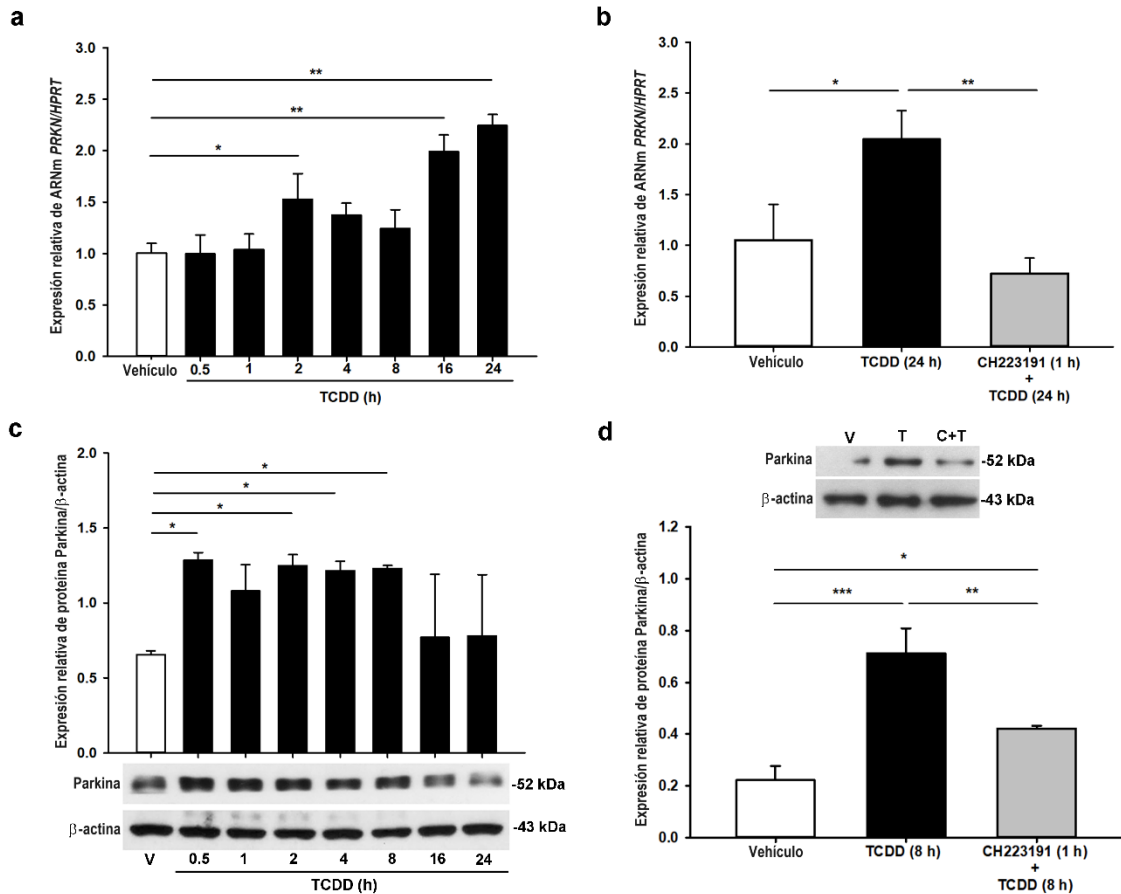


Figura 8. Efectos del TCDD sobre la expresión de la Parkina. a) Niveles de ARNm de *PRKN* inducidos por el TCDD. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con vehículo DMSO (0.02%) o TCDD (10 nM) durante 0.5-24 horas. Se extrajo ARN total y se determinaron los niveles de ARNm de *PRKN* mediante RT-qPCR; los resultados se normalizaron a la expresión del gen de referencia *HPRT*. b) Evaluación de la expresión de ARNm de *PRKN* dependiente del AHR. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con vehículo DMSO (0.02%) durante 24 horas, TCDD (10 nM) durante 24 horas, o CH223191 (10 μM) durante 1 hora antes de TCDD (10 nM) durante 24 horas. Los niveles de expresión del ARNm de *PRKN* se determinaron mediante RT-qPCR utilizando la expresión de *HPRT* para normalizar los datos. c) Niveles de proteína de Parkina inducidos por el TCDD. Se realizó una curva de tiempo de tratamiento con TCDD (10 nM) desde 0.5 hasta 24 horas para evaluar los niveles de proteína de Parkina. Los extractos de proteínas totales se sometieron a Western blot y los niveles de proteína de Parkina se analizaron mediante densitometría utilizando β-actina como control de carga. Debajo de la gráfica se muestra una imagen representativa de Parkina y β-actina en células SH-SY5Y tratadas con TCDD. d) Evaluación de la expresión de proteína de Parkina dependiente del AHR. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con vehículo DMSO (0.02%) durante 8 horas, TCDD (10 nM) durante 8 horas, o CH223191 (10 μM) durante 1 hora antes de TCDD (10 nM) durante 8 horas. Los extractos de proteínas totales se sometieron a Western blot y los niveles de expresión de proteína se analizaron como en el panel c. Los resultados están expresados como el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Para evaluar la significancia estadística se realizaron pruebas ANOVA y post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

Es importante mencionar que el incremento en los niveles de la proteína de Parkina fue observado antes de la inducción de ARNm (2 horas, Figura 8a), lo que podría sugerir que el TCDD no solo tiene efectos transcripcionales sino también post-transcripcionales sobre la expresión de la Parkina. En conjunto, estos resultados indican que la activación transcripcional del AHR modula de manera positiva los niveles de ARNm y proteína de la Parkina.

Con el objetivo de caracterizar el mecanismo molecular de regulación del gen *PRKN*, clonamos río arriba de un gen reportero de luciferasa en el vector pGL4-luc, un fragmento de aproximadamente 1 kb de la región promotora del gen *PRKN* (desde -970 pb hasta +15 pb respecto al TSS, Figura 9).

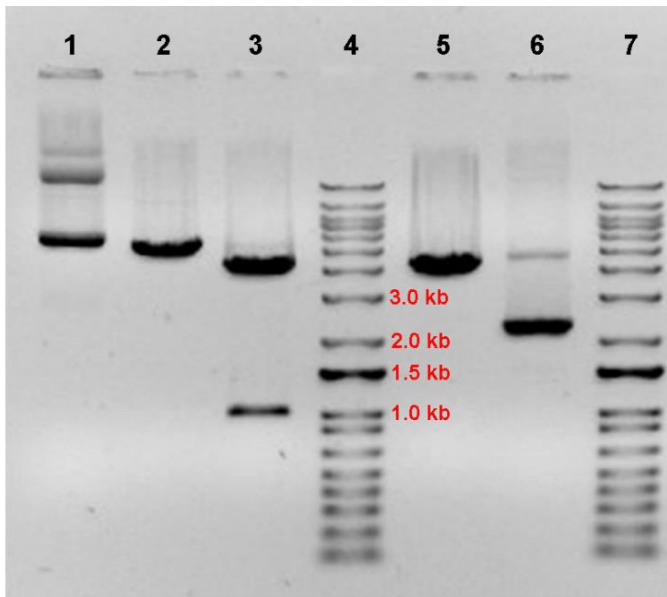


Figura 9. Caracterización del vector recombinante pGL4-*PRKN* (-970/+15) mediante digestiones con las enzimas de restricción KpnI y XhoI. El tamaño esperado del vector recombinante pGL4-*PRKN* (-970/+15) es de ~5.3 kb (carril 2) y el tamaño del fragmento liberado del promotor de *PRKN* es de ~1 kb (carril 3 banda inferior). Además, se muestran los tamaños del vector vacío pGL4.10[luc2] linearizado (carril 5, ~4.2 kb) y las conformaciones de los vectores sin digerir (carril 1 y 6). Los carriles 4 y 7 muestran el marcador de peso molecular de 1 kb.

El vector recombinante pGL4-*PRKN* (-970/+15) fue transfectado a las células SH-SY5Y y después de 24 horas se realizaron tratamientos con TCDD 10 nM durante 6 y 24 horas. Lo anterior, para evaluar los efectos de la exposición al TCDD sobre la transactivación del promotor del gen de *PRKN* en las células de NB a tiempos cortos y prolongados. En la figura 10a se observa como la actividad de luciferasa generada por pGL4-*PRKN* (-970/+15) en condiciones basales (vehículo) fue significativamente más alta que la del vector vacío (pGL4-luc), lo que indica que la

región promotora clonada tiene funcionalidad transcripcional. De manera importante, después de 24 horas de tratamiento con TCDD, la actividad luciferasa se incrementó 2 veces más. Por el contrario, no se observaron cambios a las 6 horas de tratamiento con TCDD. Esto indica que la exposición prolongada a TCDD (más de 6 horas) lleva a la transactivación del promotor del gen de *PRKN* y que la exposición a tiempos menores de 6 horas no es suficiente para observar incrementos en la activación transcripcional del gen *PRKN*.

Posteriormente, evaluamos si la activación del AHR resultaba en su reclutamiento al promotor del gen *PRKN*. Mediante ChIP se determinó la unión del AHR a la región que incluye los dos XREs dentro del promotor de *PRKN*. El ensayo de ChIP es una técnica de biología molecular que ha sido adoptada como el método maestro para analizar la interacción de proteínas, especialmente FT, con el ADN en su forma nativa. Esta técnica emplea anticuerpos específicos contra el FT de interés, que se utilizan para aislar, por medio de inmunoprecipitación, las regiones del ADN donde el FT se encuentra unido. Posteriormente, combina la técnica de q-PCR para estimar el enriquecimiento de esta unión por medio de la amplificación de la secuencia de interés a la cual se espera encontrar unido al FT (73).

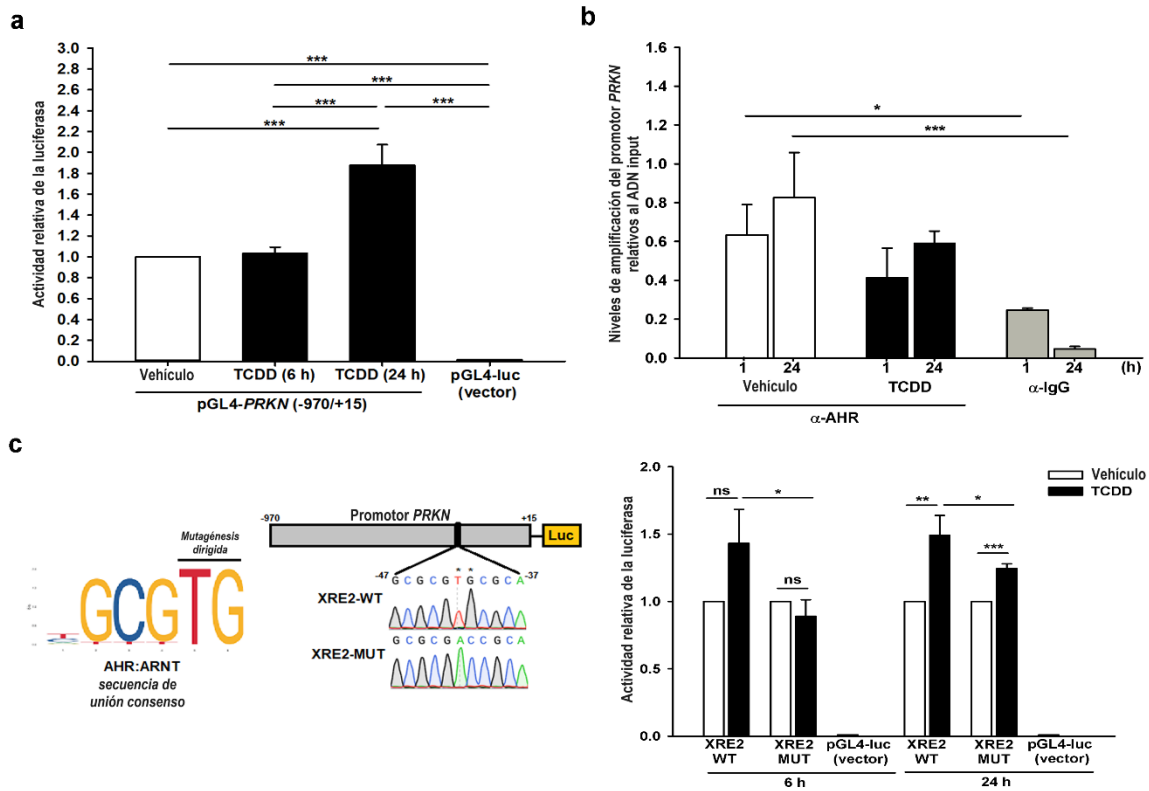


Figura 10. Caracterización de la regulación transcripcional del gen *PRKN* mediada por el AHR activado con TCDD. a) Transactivación del promotor de *PRKN* mediada por el TCDD. Las células SH-SY5Y se co-transfectaron con pGL4-luc (vector control) más pRL-null o pGL4-*PRKN* (-970/+15) más pRL-null. Después de 24 horas post-transfección, las células se incubaron con vehículo (DMSO al 0.02%) durante 24 horas o con TCDD (10 nM) durante 6 y 24 horas. Se obtuvieron los extractos de proteínas y se determinó la actividad de la luciferasa normalizando los datos a la actividad de Renilla (pRL-CMV). Se muestra el cambio en la actividad de luciferasa en comparación con el vehículo. b) Evaluación del reclutamiento del AHR activado por TCDD en el promotor del gen *PRKN*. Las células SH-SY5Y incubadas con vehículo o TCDD (10 nM) durante 1 y 24 horas se usaron para el análisis de ChIP utilizando dos anticuerpos específicos para el AHR y uno para IgG de ratón no específico. Para el paso final de qPCR, se utilizaron cebadores específicos para la región que flanquea los dos XRE de AHR:ARNT (desde -116 hasta -24 pb, consultar Figura 5) en el promotor del gen *PRKN*. Los niveles de amplificación del promotor se calcularon en relación al ADN input. c) Influencia del sitio de unión conservado XRE2 sobre la activación transcripcional de *PRKN* mediada por el TCDD. El sitio XRE2 dentro de pGL4-*PRKN* (-970/+15) se mutó en los dos nucleótidos más conservados T y G para generar el constructo mutante XRE2-MUT (lado izquierdo). Los constructos XRE2 silvestre (XRE2-WT) o XRE2-MUT dentro de pGL4-*PRKN* (-970/+15) o el vector control pGL4-luc, fueron co-transfectados junto con pRL-null dentro de las células SH-SY5Y, seguido de tratamientos tanto con TCDD (10 nM) y con DMSO (0.02%), ambos por 6 y 24 horas. La actividad de la luciferasa se determinó normalizando los datos a la actividad de Renilla (pRL-CMV). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizaron pruebas ANOVA y post-hoc de Bonferroni (en a y b) o t de Student (en c) para evaluar la significación estadística. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.002$.

Se ha reportado que la unión del AHR a sus genes blanco es mayor a la primera hora de tratamiento con sus agonistas (72); por lo tanto, examinamos la unión del AHR al promotor del gen *PRKN* a 1 hora del tratamiento con TCDD. Como se muestra en la figura 10b, se observa la unión basal del AHR a la región del promotor del gen *PRKN* que incluye los XRE localizados en el análisis *in silico* (-116 a -24 pb, Figura 5), dado que la amplificación de esta región fue significativamente mayor en los ensayos con vehículo y α -AHR comparado con los ensayos con vehículo y α -IgG. Interesantemente, el tratamiento con TCDD no incrementó la unión basal del AHR al promotor del gen *PRKN* comparado con el vehículo control. En contraste, hubo una tendencia a una menor unión (Figura 10b). Estos resultados fueron similares a 1 hora y 24 horas de tratamiento con TCDD, indicando que la regulación positiva de Parkina mediada por el AHR no depende directamente de la unión de este FT al promotor del gen *PRKN* y sugiriendo que podría estar involucrada la participación de otros factores que regulan a la Parkina río abajo de la activación del AHR por el TCDD.

El análisis *in silico* del promotor de *PRKN* reveló dos sitios putativos de unión del heterodímero AHR:ARNT (Figura 5), el XRE1 y XRE2. De estos, el XRE2 tiene un alto grado de conservación entre especies (Figura 6) lo que sugiere su importancia funcional en la regulación de *PRKN*. Con el objetivo de evaluar la contribución del XRE2 en la activación transcripcional de *PRKN*, se mutaron las dos bases más conservadas (T y G) de la secuencia de unión consenso reportada para el AHR:ARNT (matriz de unión MA0006.1, JASPAR) y se realizaron ensayos de luciferasa. Como se muestra en la figura 10c, la mutación del XRE2 disminuye la transactivación de *PRKN* promovida por el TCDD. Sin embargo, una activación residual pero significativa sigue siendo observada a pesar de la mutación de este sitio. Esto sugiere que bajo el tratamiento con TCDD la inducción de *PRKN* está mediada por mecanismos dependientes e independientes de este motivo de unión. Sin embargo, dado que los ensayos de ChIP no mostraron la unión del AHR al promotor de *PRKN* (Figura 10b), la regulación positiva de la Parkina inducida por el TCDD podría estar regulada por la unión de otros FT diferentes al AHR; tales como ATF4, CREB1, HIF1 α , NRF1 y p53 (Figura 5).

Dado que la inducción de la expresión de la Parkina mediada por el TCDD no depende directamente de la unión del AHR al promotor, investigamos potenciales reguladores de Parkina que podrían estar involucrados en la señalización del AHR. Para ello, realizamos una extensa revisión bibliográfica basada en los SUFTs que se predijeron en el análisis *in silico*. La figura 5 muestra a los FT asociados con la regulación positiva (color verde) o negativa (color azul) del promotor del gen *PRKN* junto con su respectivo PMID donde se reporta la evidencia experimental. Entre estos, se identificó a ATF4, CREB1, HIF1 α , NRF1 y p53, como reguladores directos del gen *PRKN* a través de su unión al promotor (demostrado por ensayos de ChIP) (74-77). Para identificar al candidato más plausible asociado con la señalización del AHR, se utilizó la base de datos STRING para generar redes de interacción proteína-proteína de los FTs conocidos por regular a *PRKN*. El análisis se realizó con un puntaje mínimo de confianza de 0.9 (máxima confianza) para predecir un posible vínculo entre AHR:ARNT y los FTs que, según la evidencia científica, regulan positivamente a *PRKN*. Estos fueron HIF1 α , ATF4, CREB1, TP53 y NRF1. Como se ilustra en la figura 11a, el análisis reveló un considerable número de interacciones entre HIF1 α y AHR:ARNT, así como CREB1:ATF4 y AHR:ARNT. Entre estas, seleccionamos a CREB1:ATF4 como mediadores potenciales entre AHR y *PRKN*, basados en evidencia sólida que demuestra la capacidad de ATF4:CREB1 para modular la expresión génica de *PRKN* en nuestro mismo modelo de estudio, las células de NB SH-SY5Y (75, 78-81). Aunado a esto, evidencia emergente ha propuesto al gen de *ATF4* como un blanco del AHR (82, 83).

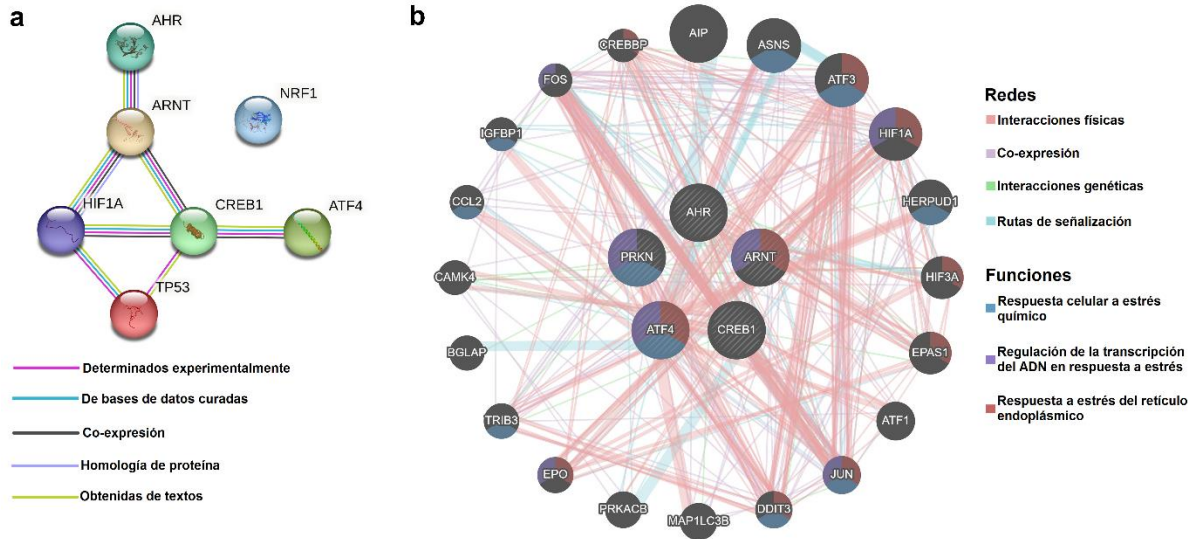


Figura 11. Análisis de las redes de interacción de los posibles intermediarios en el eje AHR-PRKN. a) Redes de interacción proteína-proteína de los FT que regulan positivamente al gen *PRKN* (tomados de la Figura 5). La predicción se realizó en la base de datos STRING estableciendo un valor mínimo de interacción de 0.9 (máxima confianza). b) Redes de interacción gen-gen entre AHR:ARNT, ATF4:CREB1 y PRKN. La predicción se realizó utilizando el servidor GeneMANIA. Los nodos representan genes, mientras que las líneas representan las interacciones. Los nodos con rayas muestran los genes de entrada para el análisis, mientras que los nodos no rayados representan otros genes predichos que interactúan. El relleno de colores de los círculos indica funciones celulares relacionadas (código de colores a la derecha). Cada código de color de las líneas representa el tipo de interacción predicho (código de colores a la derecha), y el grosor indica el grado de la red de interacción. Las interacciones se consideraron estadísticamente significativas con un FDR <0.05. GeneMANIA calcula los valores de FDR utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg, que está integrado en su servidor de acceso libre.

Para investigar aún más las posibles asociaciones entre CREB1:ATF4, AHR:ARNT y *PRKN*, se construyeron redes de interacción génica utilizando el servidor de GeneMANIA. Este análisis se realizó ingresando los genes *AHR*, *ARNT*, *ATF4*, *CREB1* y *PRKN*. Los resultados revelaron una probable conexión entre estos factores a través de diversas redes, que incluyen interacciones físicas, co-expresión, interacciones genéticas y rutas de señalización compartidas (Figura 11b). Es importante destacar que también se identificó que estos genes comparten su participación en procesos biológicos relacionados con el estrés celular, los cuales

están indicados por las áreas de colores dentro de los círculos en la figura 11b. Estos procesos incluyen la respuesta celular al estrés químico, la regulación de la transcripción de ADN en respuesta al estrés y la respuesta al estrés del retículo endoplasmático (RE). Basándonos en las redes de interacción predichas por STRING y GeneMANIA, proponemos que un eje AHR-ATF4-*PRKN* podría ser biológicamente plausible. Apoyando esta hipótesis, diversos estudios han descrito que el gen *PRKN* es un objetivo transcripcional directo de ATF4 en las células SH-SY5Y (75, 79). Por otra parte, otros estudios han encontrado que varios ligandos del AHR, incluyendo el TCDD, pueden aumentar los niveles de ARNm y proteína de ATF4 en diversos modelos celulares (83-85). Sin embargo, a la fecha no existe evidencia que vincule la señalización del AHR con la vía ATF4-*PRKN*.

Considerando esta información, postulamos que existe una asociación convincente entre la señalización AHR-ATF4 y la sobreexpresión de Parkina. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar los niveles de expresión de ATF4 tras la activación del AHR por TCDD.

La traducción del ARNm de ATF4 se encuentra reprimida en condiciones normales y la presencia de proteína de ATF4 es indicativo de su actividad como FT (86). Por lo que inicialmente evaluamos los niveles de expresión de proteína de ATF4 en respuesta al tratamiento con TCDD. Dado que la inducción más temprana de ARNm de *PRKN* fue a las 2 horas de tratamiento con esta dioxina. Verificamos que en un lapso de tiempo de 0.5 a 2 horas de tratamiento existiera una inducción de los niveles de ATF4. El análisis por Western blot reveló un aumento significativo en los niveles de proteína de ATF4 desde los 30 minutos de tratamiento con TCDD (Figura 12a). El incremento en los niveles de ATF4 fue acompañado por la inducción en los niveles de proteína CYP1A1, lo que indica que junto con la inducción de ATF4, se está activando la señalización del AHR (Figura 12a).

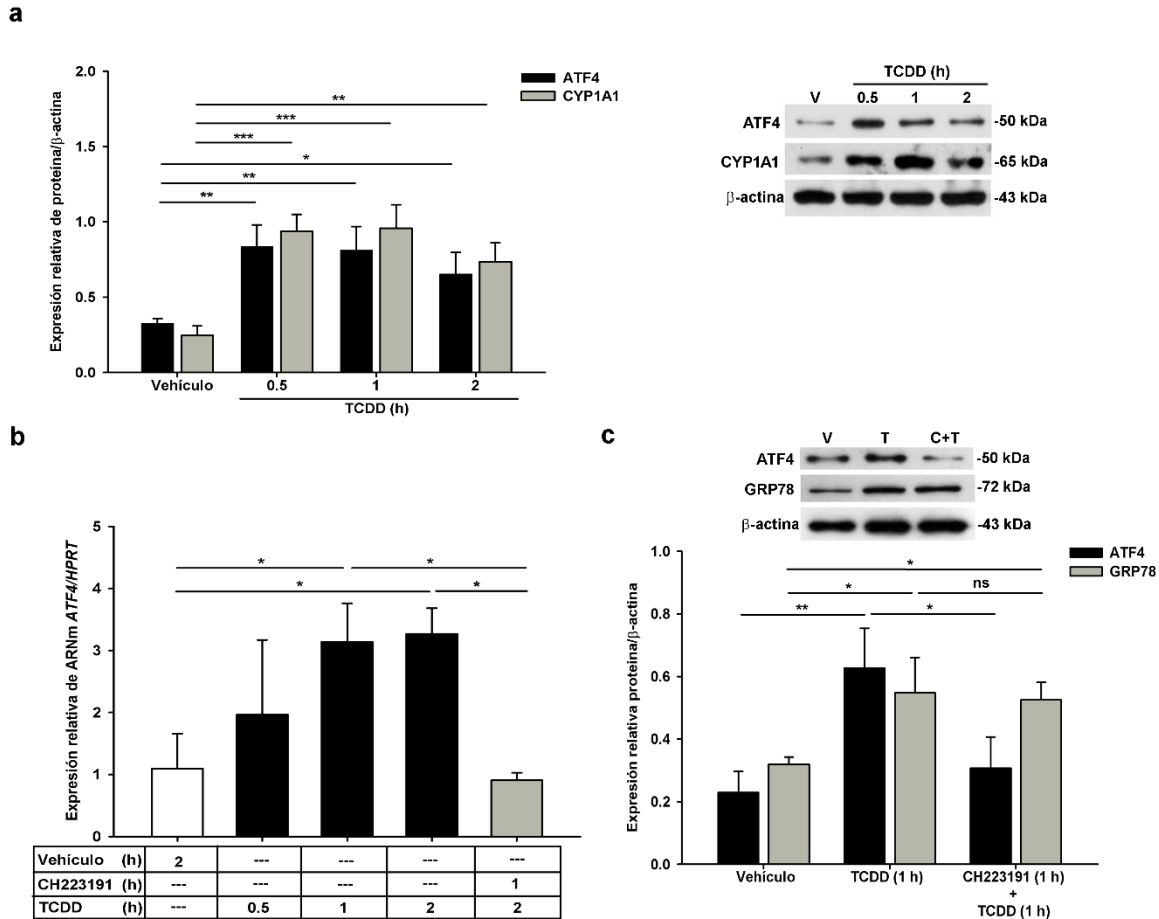


Figura 12. Efectos del AHR activado por TCDD sobre los niveles de expresión de ATF4 y el estrés del RE. a) Niveles de expresión de proteína de ATF4 y CYP1A1 bajo el tratamiento con TCDD. Las células SH-SY5Y se trataron con vehículo (DMSO al 0.02%) durante 2 horas o con TCDD (10 nM) durante 0.5, 1 y 2 horas. Los extractos de proteínas totales se sometieron a Western blot, y la expresión de proteínas se analizó mediante densitometría utilizando β -actina como control de carga. b) Niveles de expresión de ARNm de *ATF4* inducido por la activación de AHR con TCDD. Las células SH-SY5Y se trataron con vehículo durante 2 horas, TCDD (10 nM) durante 0.5, 1 y 2 horas, o se preincubaron con CH223191 (10 μ M) durante 1 hora antes del tratamiento con TCDD (10 nM) durante 2 horas. Los niveles de ARNm de *ATF4* se determinaron mediante RT-PCR y se normalizaron a la expresión del gen de referencia *HPRT*. c) Efectos de la activación del AHR mediada por TCDD sobre los niveles de proteínas de GRP78 y ATF4. Las células SH-SY5Y se trataron con vehículo durante 1 hora, TCDD (10 nM) durante 1 hora, o CH223191 (10 μ M) durante 1 hora antes del tratamiento con TCDD (10 nM) durante 1 hora. Los extractos de proteínas totales se sometieron a Western blot, y la expresión de proteínas se analizó mediante densitometría utilizando β -actina como control de carga. En todos los casos los resultados se representan como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizaron pruebas ANOVA y post-hoc de Bonferroni para evaluar la significación estadística. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, ns = no significativo.

Posteriormente, investigamos si la activación del AHR mediada por TCDD influye en la expresión de ATF4 a nivel de ARNm. La Figura 12b muestra que la dioxina condujo a un aumento significativo en los niveles de ARNm de *ATF4* después de 1 y 2 horas de tratamiento, mientras que a las 0.5 horas el incremento no alcanzó la significancia estadística. De manera importante, cuando bloqueamos la activación del AHR con CH223191 la inducción de ARNm de ATF4 se abate, esto sugiere que la inducción de ATF4 depende de la activación transcripcional del AHR. Notablemente, se observaron incrementos en los niveles de proteína ATF4 antes de la inducción de ARNm, lo que sugiere una posible modulación de la traducción de ATF4 por el tratamiento con TCDD.

ATF4 es un FT cuya traducción se activa como respuesta al estrés del RE (87). De la mano con esto, estudios previos en otros modelos celulares han demostrado que el TCDD activa las vías de respuesta al estrés del RE, que culminan en la activación de la cascada de señalización PERK-eIF2 α (88). La activación de PERK-eIF2 α lleva a la estimulación de la traducción de ARNm de ATF4, aumentando así los niveles de proteína de ATF4 (87).

Con base a lo anterior, investigamos si en nuestro modelo de estudio el aumento de ATF4 mediado por el TCDD estuvo acompañado por la activación de la respuesta al estrés del RE, así como la participación del AHR en este proceso. Con este fin, examinamos el efecto del tratamiento con TCDD en la inducción del marcador de respuesta al estrés del RE GRP78. GRP78 o Bip es una proteína chaperona que se encuentra anclada a receptores de la membrana del RE manteniéndolos inactivos. Pequeñas perturbaciones celulares que afecten la homeostasis del RE activarán la ruta de proteínas mal plegadas (UPR), que a su vez liberarán a GRP78 de los receptores del RE, activando rutas de respuesta al estrés con el objetivo de restaurar el balance (89, 90). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas normales, GRP78 se expresará a un nivel bajo, pero en condiciones de estrés del RE, se desencadenará su aumento. Nuestros resultados muestran que después de 1 hora de tratamiento con TCDD los niveles de GRP78 aumentaron significativamente. Interesantemente, el incremento de GRP78 no fue mediado por la activación del

AHR, ya que su inducción no fue bloqueada por el CH223191 (Figura 12c). Estos resultados indican que el estrés temprano del RE es inducido por el TCDD y no propiamente por la activación del AHR. Sin embargo, bajo este ambiente de estrés, el AHR sí influencia tanto la expresión del gen *ATF4* como los niveles de proteína. Esto indica que la inducción de Parkina promovida por el TCDD es mediada por la activación del AHR e involucra inducción de ATF4, aunque de la mano con esto, el TCDD induce estrés celular.

Varias investigaciones han evidenciado los efectos tóxicos del TCDD en las células neurales (52, 91, 92). Esto sugiere que el uso de esta dioxina para promover la activación del AHR no es una estrategia óptima para inducir a la Parkina y estudiar los posibles efectos neuroprotectores. Sin embargo, existen otros agonistas del AHR que no son neurotóxicos y que se generan endógenamente por el metabolismo celular. En este sentido, estudiamos si la activación del AHR con un ligando no tóxico también induce los niveles de Parkina.

Los resultados de ChIP revelaron que, aunque el tratamiento con TCDD no incrementó la unión de AHR al promotor del gen *PRKN*, ya existía una interacción basal del AHR con el promotor (Figura 10b). Esto sugiere que la activación endógena del AHR promueve la unión al promotor del gen *PRKN*. Los metabolitos del Trp son agonistas endógenos del AHR, y más del 95% del Trp en los mamíferos se metaboliza a través de la vía de la quinurenina; siendo este el principal catabolito de esta vía y el agonista endógeno más importante para el AHR (93). Con base a lo anterior, investigamos si la activación del AHR con quinurenina, administrada de manera exógena, influencia los niveles de Parkina. Para ello, inicialmente tratamos a las células SH-SY5Y con 100 μ M de quinurenina y evaluamos los efectos sobre *PRKN* a nivel transcripcional. Como se observa en la figura 13a, la activación de AHR por quinurenina resultó en el aumento de los niveles de ARNm de *PRKN* desde los 30 minutos de tratamiento, la cual se mantiene a lo largo de la mayoría de los tiempos evaluados. Esto indica que a diferencia del TCDD, la inducción del gen de *PRKN* mediada por quinurenina se da a tiempos más cortos y tiene un comportamiento sostenido. Cabe destacar que, en estas células, la quinurenina está

activando eficientemente la señalización del AHR dado que también se observan incrementos en los niveles de ARNm de *CYP1A1* (Figura 13a). Asimismo, se comprobó que la inducción de *PRKN* está mediada por la activación del AHR dado que el pretratamiento con CH223191 bloqueó la inducción de ARNm (Figura 13b).

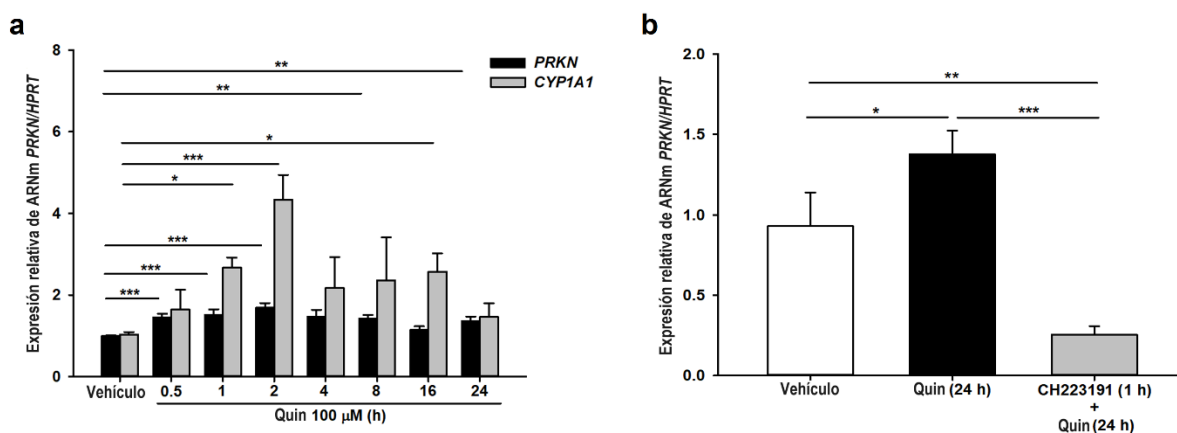


Figura 13. Efectos del AHR activado por quinurenina sobre los niveles de ARNm de Parkina.

a) Niveles de ARNm de *PRKN* y *CYP1A1* inducidos por quinurenina. Las células SH-SY5Y se trataron con vehículo (HCl 0.2 mM) durante 24 horas o con quinurenina (Quin, 100 μM) durante un período que varió de 0.5 a 24 horas. Los niveles de ARNm de *PRKN* y *CYP1A1* se evaluaron mediante RT-qPCR, y los resultados se normalizaron a la expresión endógena de *HPRT*. b) Evaluación de la expresión de ARNm de *PRKN* dependiente de AHR inducida por quinurenina. Las células SH-SY5Y se trataron con vehículo durante 24 horas, Quin (100 μM) durante 24 horas o CH223191 (10 μM) durante 1 hora antes del tratamiento con Quin (100 μM) durante 24 horas. Los niveles de expresión de ARNm de *PRKN* se determinaron mediante RT-qPCR utilizando la expresión de *HPRT* para normalizar los datos. Los resultados están expresados como el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizaron pruebas ANOVA y post-hoc de Bonferroni para evaluar la significación estadística. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.002$.

Para caracterizar el mecanismo molecular de inducción de *PRKN*, realizamos ensayos de transactivación y de CHIP. Como se observa en la figura 14a, el tratamiento con quinurenina conduce a una transactivación temprana del promotor del gen *PRKN*, con efectos observados antes de las 6 horas y que se mantienen hasta las 24 horas de tratamiento. Interesantemente, a diferencia del TCDD, la regulación positiva de *PRKN* mediada por quinurenina está dada por la unión del AHR al promotor o, en otras palabras, por la vía genómica canónica del AHR (Figura 14b). Apoyando este hallazgo, los ensayos de mutagénesis dirigida confirmaron que la regulación de *PRKN* mediada por la activación del AHR con quinurenina sigue la ruta genómica canónica, donde el XRE2 es indispensable para la transactivación del promotor (Figura 14c). Además, la quinurenina no solo influencia los niveles de la Parkina a nivel transcripcional, sino que también a nivel traduccional, promoviendo la expresión de proteína de Parkina de manera dependiente del AHR (Figura 15a y 15b).

Es importante destacar que a diferencia del TCDD, la quinurenina no indujo los niveles de proteína de ATF4 ni el marcador de respuesta al estrés del RE GRP78 (Figura 15c), señalando que dependiendo del ligando, se pueden activar diferentes vías de señalización mediadas por el AHR.

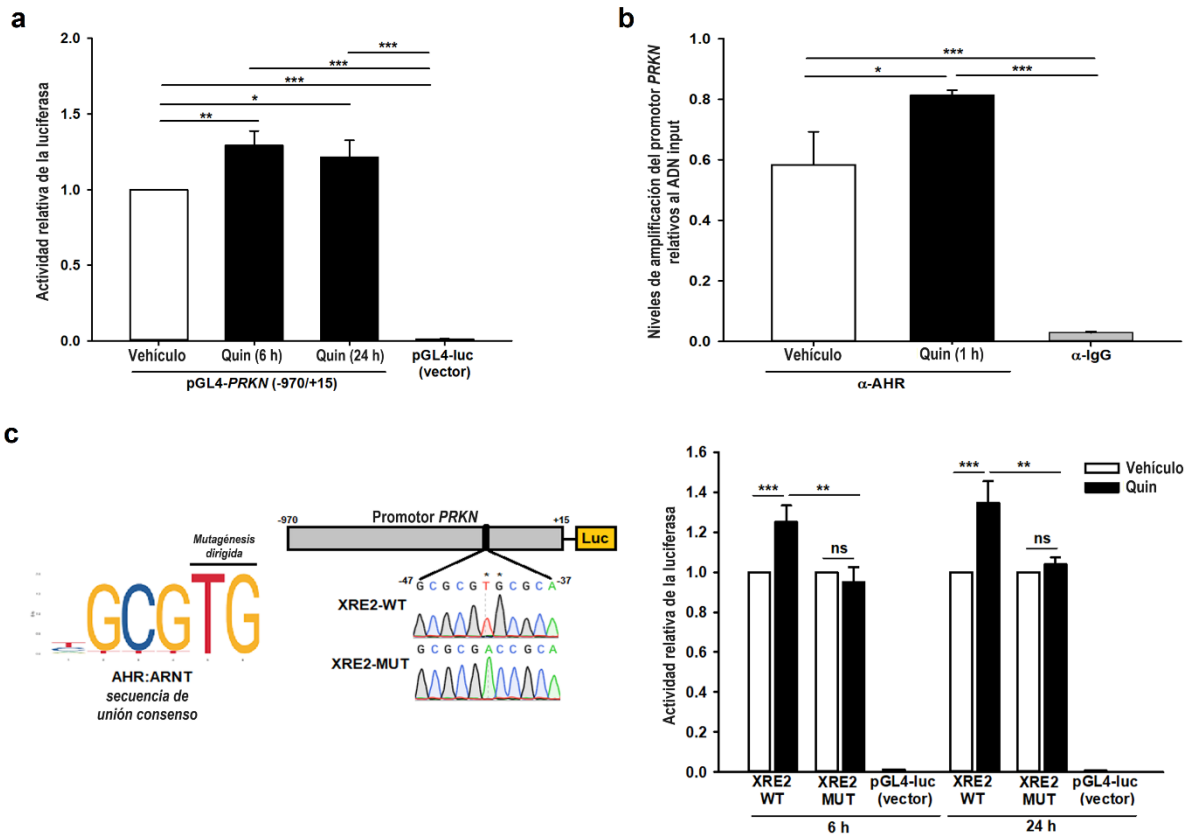


Figura 14. Caracterización de la regulación transcripcional del gen *PRKN* mediada por el AHR activado con quinurenina. a) Transactivación del promotor del gen *PRKN* mediada por Quin. Las células SH-SY5Y se co-transfectaron con pGL4-luc (vector control) más pRL-null o pGL4-*PRKN* (-970/+15) más pRL-null. Después de 24 horas post-transfección, las células se incubaron con vehículo durante 24 horas o con Quin (100 μ M) durante 6 y 24 horas, se obtuvieron los extractos proteicos y se determinó la actividad de la luciferasa normalizando los datos a la actividad de Renilla (pRL-null). La gráfica muestra el cambio en la actividad de luciferasa en comparación con el vehículo. b) Evaluación del reclutamiento del AHR activado por Quin en el promotor del gen *PRKN*. Las células SH-SY5Y se incubaron con vehículo o Quin (100 μ M) durante 1 hora y se realizaron ensayos de CHIP utilizando dos anticuerpos específicos para AHR y uno para IgG de conejo no específico. Para el paso final de qPCR, se utilizaron cebadores específicos para la región que flanquea los dos XRE de AHR:ARNT (desde -116 hasta -24 pb, consultar Figura 5) en la región promotora del gen *PRKN*. Los niveles de amplificación se calcularon en relación al ADN input. c) Influencia del sitio de unión conservado XRE2 sobre la activación transcripcional de *PRKN* mediada por la quinurenina. El sitio XRE2 dentro de pGL4-*PRKN* (-970/+15) se mutó en los dos nucleótidos más conservados T y G para generar el constructo mutante XRE2-MUT (lado izquierdo). Los constructos XRE2 silvestre (XRE2-WT) o XRE2-MUT dentro de pGL4-*PRKN* (-970/+15) o el vector control pGL4-luc, fueron co-transfectados junto con pRL-null dentro de las células SH-SY5Y, seguido de tratamientos tanto con Quin (100 μ M) y vehículo (HCl 0.2 mM) por 6 y 24 horas. La actividad de la luciferasa se determinó normalizando los datos a la actividad de Renilla (pRL-CMV). Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizaron pruebas de t de Student para evaluar la significación estadística. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.002$, ns= no significativo.

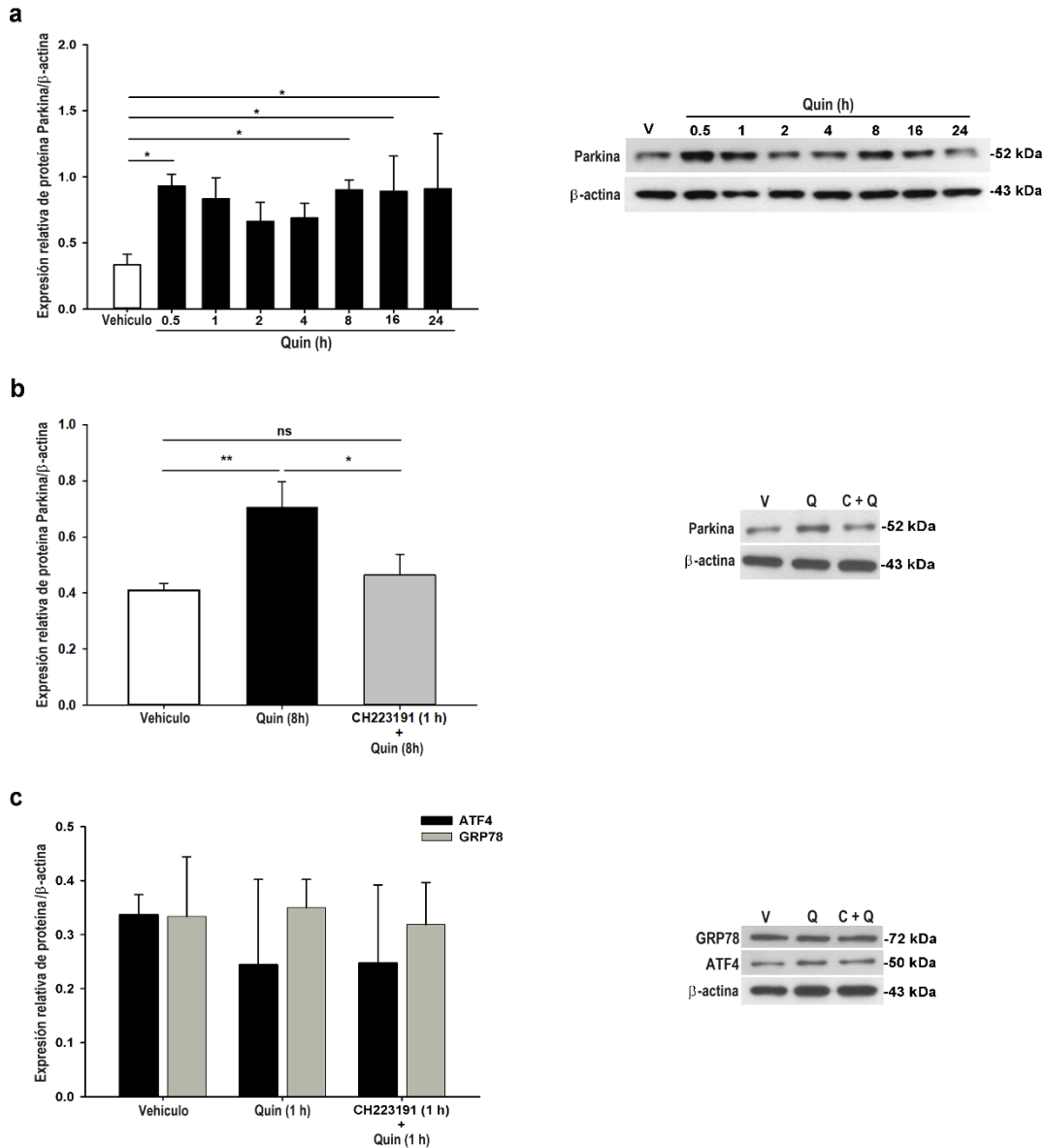


Figura 15. Efectos del AHR activado con quinurenina sobre los niveles de proteína de Parkina, GRP78 y ATF4. a) Niveles de expresión de proteína de Parkina inducidos por Quin. Se realizó una curva de tiempo de tratamiento con quinurenina (Quin 100 μ M) desde 0.5 hasta 24 horas para evaluar los niveles de proteína de Parkina. b) Evaluación de la expresión de proteína de Parkina dependiente del AHR. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con vehículo HCl (0.2 mM) durante 8 horas, Quin (100 μ M) durante 8 horas, o CH223191 (10 μ M) durante 1 hora antes de Quin (100 μ M) durante 8 horas. c) Efectos del tratamiento con quinurenina sobre los niveles de proteína GRP78 y ATF4. Las células SH-SY5Y se trataron con vehículo durante 1 hora, Quin (100 μ M) durante 1 hora o CH223191 (10 μ M) durante 1 hora antes del tratamiento con Quin (100 μ M) durante 1 hora. En todos los casos los extractos de proteína totales se sometieron a Western blot, y la expresión de proteína se analizó mediante densitometría utilizando β -actina como control de carga. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se utilizaron pruebas ANOVA y post-hoc de Bonferroni para evaluar la significación estadística. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, ns= no significativo.

Finalmente, investigamos si otros ligandos endógenos del AHR son capaces de inducir la expresión de Parkina. Para esto, se realizaron tratamientos de las células SH-SY5Y con FICZ e ITE, ambos agonistas endógenos del AHR, así como con TCDD y quinurenina durante 24 horas y se evaluaron los niveles de ARNm de *PRKN* por PCR en tiempo real. Como se muestra en la figura 16, ambos ligandos incrementan los niveles de expresión de *PRKN*, similar a lo observado con quinurenina.

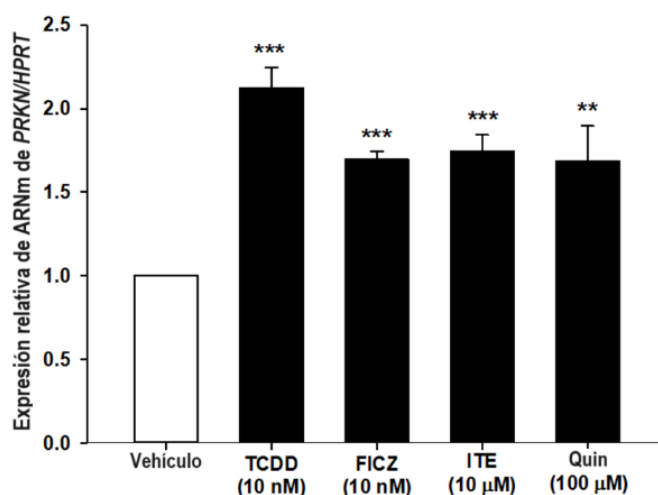


Figura 16. Comparación del efecto de diferentes ligandos del AHR sobre los niveles de expresión de ARNm de *PRKN*. Se trataron células SH-SY5Y con TCDD (10 nM), FICZ (10 nM), ITE (10 mM) y quinurenina (Quin, 100 mM) durante 24 horas. Terminando el tratamiento se extrajo el ARN total y los niveles de ARNm de *PRKN* se determinaron por RT-qPCR. Los resultados fueron normalizados con la expresión endógena de *HPRT* y comparados contra el vehículo control (normalizado a 1 para efectos comparativos). Los datos están presentados como promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se utilizaron pruebas ANOVA y post-hoc de Bonferroni para evaluar la significación estadística. ** $p > 0.005$ *** $p < 0.001$ comparado con el vehículo control.

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que el AHR regula la expresión de la Parkina humana en células neurales a través de mecanismos diferentes mediados por el tipo de agonista. La activación del AHR por el ligando endógeno y no tóxico quinurenina induce la expresión de Parkina de manera directa, mientras que el ligando exógeno y tóxico TCDD induce la expresión de Parkina de manera indirecta a través de una vía que involucra la inducción de ATF4 mediada por el AHR y que involucra rutas de estrés.

7. Discusión

Existen múltiples indicios que sugieren que la Parkina podría ser un blanco de la señalización del AHR en humanos. No obstante, hasta la fecha, no se habían realizado investigaciones sobre este mecanismo. El promotor del gen *PRKN* humano contiene dos XREs cercanos al TSS. Uno de ellos, el motivo "GGAGGCGTGA" que se encuentra a -100 pb y el otro es el motivo "CCGCGCGTGC" situado a -40 pb; este último es una secuencia similar a una E-box que se encuentra altamente conservada en múltiples especies (Figura 6). Estas secuencias son importantes en la regulación de *PRKN*, ya que se ha descrito que otros FT distintos al AHR se unen a ellas para regular la expresión génica (59, 77). Además, existe evidencia que indica que el AHR se une a motivos tipo "CGCGTG" en otros genes, tales como *THBS1*, lo que sugiere que este FT también podría unirse al motivo "CCGCGCGTGC" ubicado a -40 pb dentro del promotor del gen *PRKN* (94).

Estudios realizados en nuestro grupo de investigación indican que el gen *Prkn* de ratón es regulado por el AHR activado con TCDD (15), sin embargo, el mecanismo subyacente que regula la expresión de *PRKN* mediada por el AHR en células humanas había permanecido sin aclararse hasta este trabajo. La evidencia experimental demuestra que varios compuestos químicos y naturales promueven la expresión de ARNm y proteína de la Parkina. Estos compuestos incluyen al benzo[*a*]pireno en células del hipocampo de rata (95), a la 1,4-benzoquinona en células promieloblásticas HL-60 humanas (53), a la aflatoxina B1 en riñones y bazo de ratón (54, 96, 97), y a la dopamina en células de NB SH-SY5Y (55, 98). Curiosamente, estos compuestos también son ligandos del AHR, lo que sugiere que la regulación positiva de la Parkina observada en dichos estudios podría estar mediada por este FT. Adicionalmente, las investigaciones en donde el tratamiento con agentes exógenos induce la expresión de la Parkina, indican que estos incrementos además son funcionalmente relevantes ya que también se promueve la mitofagia y la protección celular contra la toxicidad provocada por estos compuestos. Lo anterior demuestra que la sobreexpresión de la Parkina en

respuesta al estrés celular es un mecanismo neuroprotector cuyo objetivo es restaurar la homeostasis celular.

En el presente estudio, el tratamiento de las células de NB SH-SY5Y con TCDD indujo la expresión de la Parkina a nivel transcripcional, así como a nivel de proteína. La inducción transcripcional fue más notable después de la exposición prolongada al TCDD. Además, la regulación transcripcional de *PRKN* fue mediada por el AHR dado que el uso de su antagonista CH223191 bloqueó la inducción de ARNm de *PRKN*. Interesantemente, el TCDD no indujo la unión del AHR al promotor de *PRKN* humano, según los hallazgos obtenidos mediante el análisis de ChIP (Figura 10b). Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, indican que en el mesencéfalo ventral de ratón la regulación de *Prkn* sí está mediada por la unión del AHR al promotor tras la exposición a TCDD (15). Estas diferencias entre especies podrían deberse a que la secuencia promotora de *Prkn* de ratón contiene tres XREs en lugar de los dos que contiene el promotor de *PRKN* humano. De hecho, ensayos de EMSA confirmaron la unión del AHR a un XRE en el promotor del gen *Prkn* de ratón, el cual no está presente en el humano (15). Aunado a esto, se ha demostrado que el TCDD tiene una mayor afinidad por el AHR de ratón en comparación con el AHR humano, lo que puede llevar a mecanismos de regulación diferenciales entre estas dos especies (99, 100).

Aunque el TCDD no promovió la unión del AHR al promotor de *PRKN* (Figura 13b), sí indujo su transactivación a las 24 horas de tratamiento (Figura 10a). Además, los ensayos de mutagénesis dirigida revelaron que el XRE2 es parcialmente requerido para la transactivación de *PRKN* mediada por el TCDD (Figura 10c). Esto sugiere, por una parte, que puede haber otros FTs (distintos al AHR) que bajo el tratamiento con TCDD están regulando a *PRKN* por medio de la unión a este sitio. Estos podrían ser HIF1 α y NRF1, que se sabe regulan a la Parkina por medio de la unión al XRE2. Por otro lado, el hecho de encontrar activación transcripcional a pesar de la mutación, sugiere que otros FTs que no se unen a este sitio serían importantes para regulación de *PRKN* bajo el tratamiento con TCDD.

Se ha propuesto que varios FT activados en respuesta al estrés celular son capaces de aumentar la expresión de *PRKN*; estos incluyen a CREB, ATF4, HIF1 α y NRF1 (55, 74, 75, 77, 78). Respecto al AHR, algunos estudios lo señalan como generador de estrés celular, mientras que otros estudios indican que lo mitiga; por lo tanto, no está claro cómo la señalización del AHR puede dirigirse a respuestas neurotóxicas o neuroprotectoras, en particular bajo la activación con TCDD (101-105). Por lo tanto, no se puede establecer una contribución específica del AHR a la neurotoxicidad celular. Aunque no se ha dilucidado exactamente la contribución del AHR, existen otros estudios que relacionan al TCDD de manera directa con la toxicidad en las células de NB al aumentar los niveles de Ca²⁺ intracelular, un evento inicial en la vía de estrés del RE (104, 105). En nuestro modelo experimental es probable que la señalización del AHR mediada por el TCDD induzca la expresión de la Parkina para mitigar los efectos tóxicos de esta dioxina.

En las células neurales, el TCDD induce estrés en el RE al promover la acumulación de proteínas mal plegadas, lo que lleva a la activación de la vía de UPR (88). La proteína chaperona GRP78 es un sensor temprano del estrés del RE que inicia vías de señalización citoprotectoras (106). Tras la inducción del estrés en el RE, GRP78 se disocia de IRE1 α , PERK y ATF6, lo que permite la autofosforilación de éstos y su activación subsiguiente. Esto lleva a la activación de tres ramas de la vía de UPR: PERK-eIF2 α , que activará la traducción ATF4; IRE1, que activará la expresión de XBP-1; y ATF6, que activará la traducción del mismo ATF6 (86). Los objetivos posteriores de estas ramas ayudan a restablecer la homeostasis celular en condiciones de estrés agudo, pero pueden llevar a la apoptosis neuronal bajo estrés sostenido (88, 107).

Se ha reportado que varios ligandos del AHR, incluido el TCDD, pueden activar la rama PERK-eIF2 α pero no las vías IRE1 y ATF6 en células neurales PC12 (88, 105). En el presente estudio observamos un aumento en los niveles de proteína GRP78 después de 1 hora de exposición a 10 nM de TCDD, lo que indica la activación de la respuesta al estrés en el RE (Figura 12c). En concordancia con esto, otro estudio realizado en células neurales PC12 reportó la inducción temprana

de la proteína GRP78 después de la exposición a 100 nM de TCDD (88). Esto sugiere que la exposición a la dioxina desde bajas concentraciones activa rutas de respuesta a estrés del RE en células neurales, probablemente como un mecanismo de protección temprana a la toxicidad ejercida por el compuesto.

Otra interrogante importante, es si los efectos del TCDD sobre el estrés del RE son mediados por el AHR ya que los ligandos del AHR pueden generar toxicidad de manera dependiente o independiente del AHR (105). En este contexto, nuestros hallazgos demuestran que la inducción temprana al estrés en el RE después del tratamiento con TCDD es independiente del AHR, ya que al inhibir la señalización del AHR con CH223191 no se afectó la expresión de GRP78 (Figura 12c).

Aunque el TCDD induce la transcripción del gen *PRKN* de manera dependiente del AHR, la ausencia de unión de éste al promotor sugiere la participación de otros factores dentro de la vía *AHR-PRKN*. Las predicciones de redes de interacción indican que ATF4 podría estar participando río abajo del AHR y río arriba de *PRKN* (Figura 11a y 11b). ATF4 es un FT que se induce tanto a nivel transcripcional como traduccional en condiciones de estrés del RE (108). Además, específicamente en las células SH-SY5Y, se ha visto que ATF4 es un factor clave en la regulación de la expresión de la Parkina inducida por el estrés (75, 78). ATF4 se une a un sitio CREB-ATF en el promotor del gen *PRKN* activando su transcripción y promoviendo vías citoprotectoras en las células neurales (79-81). Nuestros hallazgos demuestran que el TCDD aumenta significativamente los niveles de proteína de ATF4, con un comportamiento similar a lo observado con los niveles de Parkina (Figura 8 y Figura 12). Además, la inducción de ATF4 fue mediada por la activación transcripcional del AHR, ya que el pretratamiento con CH223191 previno este efecto (Figura 12c). La activación del AHR por el TCDD también resultó en un aumento en los niveles de ARNm de *ATF4*, lo que sugiere una posible regulación transcripcional de ATF4 mediada por el AHR. De acuerdo con nuestros datos, varias líneas de evidencia respaldan la asignación de ATF4 como un gen blanco del AHR, especialmente en las vías de señalización mediadas por el estrés (82-85, 109). De hecho, ensayos de luciferasa han confirmado que el gen *ATF4* es un blanco transcripcional directo del

AHR, ya que su actividad promotora aumentó después de la activación del AHR con omeprazol en células hepáticas (83). Sin embargo, aunque hay evidencia que sugiere a *ATF4* como un gen blanco del AHR, se necesitan estudios adicionales para describir los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación transcripcional de *ATF4* mediada por el AHR en las células neurales.

Si bien, en este trabajo no se confirmó un vínculo directo entre AHR-*ATF4-PRKN*, tres hallazgos clave respaldan la presencia de este eje: 1) el tratamiento con TCDD induce *ATF4* antes de la inducción del ARNm de *PRKN*, 2) la inducción de *ATF4* mediada por el TCDD depende de la activación del AHR y 3) el TCDD activa la respuesta al estrés en el RE junto con la regulación positiva de la proteína *ATF4* dependiente del AHR. Estos resultados sugieren que durante la exposición al TCDD, se induce, por un lado, estrés en el RE y por otro lado la activación del AHR. Estos dos procesos contribuyen a la regulación positiva de *ATF4* y la subsiguiente inducción de la Parkina.

Se sabe que la autofagia promovida por la Parkina protege contra la apoptosis inducida por el TCDD en las células SH-SY5Y (52), por lo que la inducción de la Parkina mediada por el AHR en respuesta al TCDD podría representar una respuesta celular destinada a mitigar los efectos tóxicos de la dioxina. Si bien, aunque el resultado final de esta ruta de señalización es la inducción de la Parkina, el uso de ligandos tóxicos para activar la señalización del AHR e incrementar los niveles de la Parkina en células neurales no es una buena opción como estrategia neuroprotectora.

El análisis de ChIP reveló la presencia de la unión basal del AHR al promotor de gen *PRKN* (Figura 10b), lo que sugiere la participación de ligandos endógenos que activan al AHR y que podrían regular la expresión de la Parkina en células neurales. Dado que la vía de la quinurenina que cataboliza al Trp es altamente activa en las células SH-SY5Y (58, 93), investigamos el efecto de este ligando endógeno, no tóxico, del AHR en la expresión de la Parkina. Nuestros resultados demuestran que la quinurenina promueve la transactivación del promotor del gen *PRKN* a través de la unión directa del AHR (Figura 14a y 14b), lo que conduce a una expresión más

sostenida y temprana de ARNm de *PRKN* que lo observado con TCDD. Además, los ensayos de mutagénesis revelaron que la regulación transcripcional del gen de *PRKN* mediada por quinurenina está dirigida por la vía genómica canónica del AHR, donde el XRE2 es indispensable para la inducción transcripcional (Figura 14c).

El tratamiento con quinurenina también indujo los niveles de proteína de Parkina de manera dependiente del AHR (Figura 15a y 15b) lo que sugiere que estos incrementos podrían tener relevancia funcional en las células neurales. Además, a diferencia del TCDD, el tratamiento con quinurenina no indujo estrés en el RE, como lo demuestra la falta de inducción de los niveles de GRP78 (Figura 15c), lo que sugiere que este agonista no afecta sustancialmente el balance celular. Esto es consistente con hallazgos previos que muestran que la quinurenina y su catabolito, el ácido quinurénico, son benéficos para las células ya que reducen los marcadores de estrés en el RE en hepatocitos humanos (110). Además de la quinurenina, el FICZ y el ITE, otros ligandos endógenos del AHR también incrementaron los niveles de ARNm de *PRKN* (Figura 16), indicando que la inducción de Parkina mediada por el AHR podría ser alcanzada con varios agonistas de origen natural.

Nuestros hallazgos revelan dos mecanismos distintos dependientes del ligando mediante los cuales el AHR regula la expresión de la Parkina humana. Esto concuerda con la idea de que el AHR puede activar diferentes vías de señalización a través de mecanismos de acción clásicos y no clásicos, dependiendo del ligando involucrado (111, 112). Estudios de docking y simulaciones de dinámica molecular demuestran que el TCDD y la quinurenina interactúan de manera diferente en el dominio de unión al ligando del AHR, lo que conduce a distintas conformaciones del dominio PAS-B que pueden contribuir a la regulación selectiva de la señalización río abajo y la expresión de genes blanco (113).

En nuestro estudio, tanto el TCDD como la quinurenina regulan la expresión de Parkina. Sin embargo, identificamos diferentes mecanismos moleculares subyacentes a la inducción de Parkina mediada por el AHR. La regulación de *PRKN* inducida por TCDD parece ser una respuesta al estrés en el RE donde la inducción de ATF4, mediada por el AHR, sirve para promover la expresión de la Parkina y

restaurar el equilibrio redox. Por otro lado, la regulación al alza de Parkina mediada por la quinurenina ocurre a través de la unión directa del AHR al promotor del gen *PRKN*, lo que conduce a una inducción de ARNm de *PRKN* más temprana y sostenida que la estimulada por el TCDD. Cabe destacar que no se puede descartar la posibilidad de mecanismos de regulación de la Parkina a nivel post-transcripcional, ya que ambos ligandos aumentaron los niveles de proteína de Parkina desde los 30 minutos de tratamiento.

8. Conclusiones

Este estudio demuestra que la señalización del AHR aumenta la transcripción de la Parkina humana a través de diferentes mecanismos dependientes del ligando involucrado (Figura 17). La regulación de la Parkina mediada por el AHR bajo la activación de un ligando tóxico, como el TCDD, no implica la unión directa de AHR al promotor del gen *PRKN* (vía genómica no canónica del AHR). El aumento en los niveles de la Parkina se logra a través de vías de estrés, incluyendo el aumento de ATF4 a nivel de ARNm y de proteína. En contraste, la activación de AHR por un ligando endógeno no tóxico, como la quinurenina, conduce a una regulación transcripcional directa y temprana del gen *PRKN* mediante la unión del AHR y la transactivación del promotor del gen *PRKN* (vía genómica canónica de AHR), resultando en un aumento más sostenido de la expresión de ARNm y proteína de la Parkina. Estos hallazgos resaltan la importancia del ligando específico del AHR en el aumento de la expresión de la Parkina como una estrategia terapéutica potencial para promover la supervivencia neuronal sin causar efectos neurotóxicos, especialmente en la enfermedad de Parkinson. Por otro lado, nuestros resultados demuestran que la vía de señalización AHR-ATF4-*PRKN* podría inducir la expresión de la Parkina en algunos trastornos que involucran presencia de estrés celular agudo y crónico.

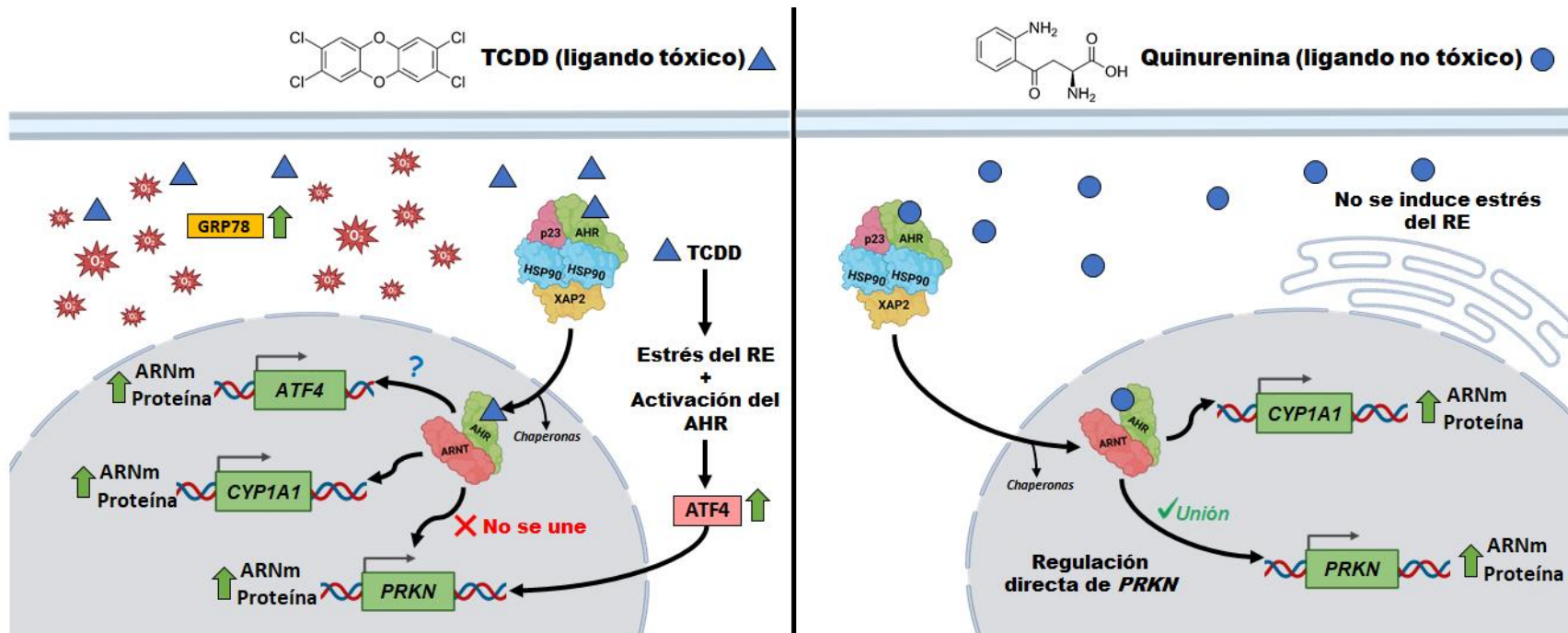


Figura 17. Mecanismos de regulación del gen *PRKN* humano mediado por el AHR. El gen *PRKN* humano es un efector molecular de la señalización del AHR en células con características neurales SH-SY5Y, donde el mecanismo molecular de regulación depende del tipo de ligando. a) La activación del AHR por un ligando potencialmente neurotóxico como el TCDD promueve indirectamente la inducción de la Parkina a través de vías que involucran el estrés en el RE y la inducción del regulador de Parkina ATF4. Esta vía de señalización no involucra la unión del AHR al promotor del gen *PRKN*. En este caso, la sobreexpresión de la Parkina mediada por el Ahr probablemente es una respuesta celular para restaurar el estrés celular inducido por el TCDD. b) La activación del AHR por un ligando no tóxico como la quinurenicina induce directamente la expresión de la Parkina al promover la unión del AHR al promotor del gen *PRKN* sin activar el estrés en el RE. Creado con BioRender.com.

9. Perspectivas

- Comprobar que la activación del AHR con otros ligandos no tóxicos inducen la expresión de la Parkina en otros modelos celulares no transformados, como cultivos primarios neuronales o modelos *in vivo*.
- Evaluar la funcionalidad de la inducción de la Parkina en modelos celulares y animales de la enfermedad de Parkinson.
- Evaluar los efectos de la inducción de la Parkina con ligandos no tóxicos del AHR en modelos celulares de estrés agudo y crónico, como estrategia para mitigar el daño celular.
- Investigar el mecanismo por el cual el AHR regula la expresión de ATF4 bajo el tratamiento con TCDD.
- Comprobar que la inducción de la Parkina mediada por el TCDD se da por la vía AHR-ATF4, por medio del silenciamiento de ATF4.

10. Apéndice I.

Artículos publicados.

Murillo-González FE, García-Aguilar R, Limón-Pacheco J, Cabañas-Cortés M, Elizondo G. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and kynurenine induce Parkin expression in neuroblastoma cells through different signaling pathways mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Lett.* 2024 Mar 2:S0378-4274(24)00042-0. doi: 10.1016/j.toxlet.2024.02.015. Epub ahead of print. PMID: 38437907.

García-Aguilar R, Ortega A, López-Bayghen E, Ramírez-Martínez L, Rodríguez-Campuzano A, **Murillo-González F**, Elizondo G, Vega L. Kynurenine attenuates mitochondrial depolarization and neuronal cell death induced by rotenone exposure independently of AhR-mediated parkin induction in SH-SY5Y differentiated cells. *Neurotoxicology.* 2023 Dec;99:282-291. doi: 10.1016/j.neuro.2023.11.007. Epub 2023 Nov 17. PMID: 37979659.

Cano-Sánchez J, **Murillo-González FE**, de Jesús-Aguilar J, Cabañas-Cortés MA, Tirado-Garibay AC, Elizondo G. The Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole Promotes Estrogen Receptor Alpha and c-Fos Protein Degradation and Inhibits MCF-7 Cell Proliferation and Migration. *Pharmacology.* 2023;108(2):157-165. doi: 10.1159/000527993. Epub 2023 Jan 19. PMID: 36657432.

Murillo-González FE, García-Aguilar R, Vega L, Elizondo G. Regulation of Parkin expression as the key balance between neural survival and cancer cell death. *Biochem Pharmacol.* 2021 Aug;190:114650. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114650. Epub 2021 Jun 7. PMID: 34111426.

Martínez-Guzmán C, Cortés-Reynosa P, Pérez-Salazar E, **Murillo-González FE**, Elizondo G. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) induces human glutathione S transferase alpha 1 (hGSTA1) expression. *Chem Biol Interact.* 2020 Nov 1;331:109284. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109284. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33035518.

11. Apéndice II

Participación en congresos.

Murillo-Gonzalez FE presented (2021, March). Cell Differentiation State of SH-SY5Y Cells Determines the Level of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Parkin Induction. Poster presented at the Society of Toxicology 60th Annual Meeting virtually.

Murillo-Gonzalez FE presented (2022, March). The Tryptophan Derivate Kynurenine Induces the Human Parkin Expression via the Aryl Hydrocarbon Receptor. Poster presented at the Society of Toxicology 61st Annual Meeting, San Diego, CA.

Murillo-Gonzalez FE presented (septiembre, 2023). Caracterización molecular de la expresión del gen de Parkina (*PRKN*) mediada por el AHR en células de NB humano. Poster presentado en la segunda reunión de exalumnos: impacto de nuestros egresados en la investigación en biología, Ciudad de México, México.

12. Referencias

1. Jiang H, Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Human molecular genetics*. 2004;13(16):1745-54.
2. Zheng L, Bernard-Marissal N, Moullan N, D'Amico D, Auwerx J, Moore DJ, et al. Parkin functionally interacts with PGC-1 α to preserve mitochondria and protect dopaminergic neurons. *Human Molecular Genetics*. 2017;26(3):582-98.
3. Finney N, Walther F, Mantel PY, Stauffer D, Rovelli G, Dev KK. The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain. *J Biol Chem*. 2003;278(18):16054-8.
4. Dawson TM, Dawson VL. The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2010;25 Suppl 1(0 1):S32-9.
5. Murillo-González FE, García-Aguilar R, Vega L, Elizondo G. Regulation of Parkin expression as the key balance between neural survival and cancer cell death. *Biochem Pharmacol*. 2021;190:114650.
6. Han K, Hassanzadeh S, Singh K, Menazza S, Nguyen TT, Stevens MV, et al. Parkin regulation of CHOP modulates susceptibility to cardiac endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep*. 2017;7(1):2093.
7. Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M, Kehoe K, Vink L, et al. Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*. 2002;36(6):1007-19.
8. Wang DB, Garden GA, Kinoshita C, Wyles C, Babazadeh N, Sopher B, et al. Declines in Drp1 and parkin expression underlie DNA damage-induced changes in mitochondrial length and neuronal death. *J Neurosci*. 2013;33(4):1357-65.
9. Yasuda T, Hayakawa H, Nihira T, Ren YR, Nakata Y, Nagai M, et al. Parkin-mediated protection of dopaminergic neurons in a chronic MPTP-minipump mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70(8):686-97.
10. Yang H, Zhou HY, Li B, Niu GZ, Chen SD. Downregulation of parkin damages antioxidant defenses and enhances proteasome inhibition-induced toxicity in PC12 cells. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007;2(3):276-83.

11. Sun X, Aimé P, Dai D, Ramalingam N, Crary JF, Burke RE, et al. Guanabenz promotes neuronal survival via enhancement of ATF4 and parkin expression in models of Parkinson disease. *Exp Neurol*. 2018;303:95-107.
12. Vacchiano V, Bartoletti-Stella A, Rizzo G, Avoni P, Parchi P, Salvi F, et al. Frequency of Parkinson's Disease Genes and Role of PARK2 in Amyotrophic Lateral Sclerosis: An NGS Study. *Genes (Basel)*. 2022;13(8).
13. Khalil B, El Fissi N, Aouane A, Cabirol-Pol MJ, Rival T, Liévans JC. PINK1-induced mitophagy promotes neuroprotection in Huntington's disease. *Cell Death & Disease*. 2015;6(1):e1617-e.
14. Goudarzi S, Hosseini A, Abdollahi M, Haghi-Aminjan H. Insights Into Parkin-Mediated Mitophagy in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:674071.
15. González-Barbosa E, García-Aguilar R, Vega L, Cabañas-Cortés MA, Gonzalez FJ, Segovia J, et al. Parkin is transcriptionally regulated by the aryl hydrocarbon receptor: Impact on α -synuclein protein levels. *Biochem Pharmacol*. 2019;168:429-37.
16. Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp Anim*. 2017;66(2):75-89.
17. Kolonko M, Greb-Markiewicz B. bHLH-PAS Proteins: Their Structure and Intrinsic Disorder. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15).
18. Rothhammer V, Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(3):184-97.
19. Lin L, Dai Y, Xia Y. An overview of aryl hydrocarbon receptor ligands in the Last two decades (2002-2022): A medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem*. 2022;244:114845.
20. Dai S, Qu L, Li J, Zhang Y, Jiang L, Wei H, et al. Structural insight into the ligand binding mechanism of aryl hydrocarbon receptor. *Nat Commun*. 2022;13(1):6234.

21. Wang Q, VonHandorf A, Puga A. Aryl Hydrocarbon Receptor. In: Choi S, editor. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York, NY: Springer New York; 2016. p. 1-15.
22. Abel J, Haarmann-Stemmann T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem*. 2010;391(11):1235-48.
23. Wu D, Potluri N, Kim Y, Rastinejad F. Structure and dimerization properties of the aryl hydrocarbon receptor PAS-A domain. *Mol Cell Biol*. 2013;33(21):4346-56.
24. Seok SH, Lee W, Jiang L, Molugu K, Zheng A, Li Y, et al. Structural hierarchy controlling dimerization and target DNA recognition in the AHR transcriptional complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(21):5431-6.
25. Schulte KW, Green E, Wilz A, Platten M, Daumke O. Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Activation. *Structure*. 2017;25(7):1025-33.e3.
26. Martínez-Guzmán C, Cortés-Reynosa P, Pérez-Salazar E, Murillo-González FE, Elizondo G. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) induces human glutathione S transferase alpha 1 (hGSTA1) expression. *Chem Biol Interact*. 2020;331:109284.
27. Juricek L, Coumoul X. The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
28. Huang X, Powell-Coffman JA, Jin Y. The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development*. 2004;131(4):819-28.
29. Qin H, Powell-Coffman JA. The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev Biol*. 2004;270(1):64-75.
30. Choudhary M, Malek G. The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Mediator and Potential Therapeutic Target for Ocular and Non-Ocular Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18).
31. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Ardura-Fabregat A, et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*. 2018;557(7707):724-8.

32. Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open*. 2018;7:1-9.
33. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*. 2003;423(6939):545-50.
34. Hankinson O. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2005;433(2):379-86.
35. Yeste A, Takenaka MC, Mascanfroni ID, Nadeau M, Kenison JE, Patel B, et al. Tolerogenic nanoparticles inhibit T cell-mediated autoimmunity through SOCS2. *Sci Signal*. 2016;9(433):ra61.
36. Wilson SR, Joshi AD, Elferink CJ. The tumor suppressor Kruppel-like factor 6 is a novel aryl hydrocarbon receptor DNA binding partner. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;345(3):419-29.
37. Tian Y, Ke S, Chen M, Sheng T. Interactions between the aryl hydrocarbon receptor and P-TEFb. Sequential recruitment of transcription factors and differential phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II at *cyp1a1* promoter. *J Biol Chem*. 2003;278(45):44041-8.
38. Wang S, Ge K, Roeder RG, Hankinson O. Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13593-600.
39. Wang S, Hankinson O. Functional involvement of the Brahma/SWI2-related gene 1 protein in cytochrome P4501A1 transcription mediated by the aryl hydrocarbon receptor complex. *J Biol Chem*. 2002;277(14):11821-7.
40. Liu KY, Wang LT, Hsu SH. Modification of Epigenetic Histone Acetylation in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1).
41. Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, et al. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*. 2007;446(7135):562-6.
42. Luecke-Johansson S, Gralla M, Rundqvist H, Ho JC, Johnson RS, Gradin K, et al. A Molecular Mechanism To Switch the Aryl Hydrocarbon Receptor from a Transcription Factor to an E3 Ubiquitin Ligase. *Mol Cell Biol*. 2017;37(13).
43. Mejía-García A, González-Barbosa E, Martínez-Guzmán C, Torres-Ramos MA, Rodríguez MS, Guzmán-León S, et al. Activation of AHR mediates the

ubiquitination and proteasome degradation of c-Fos through the induction of UbcM4 gene expression. *Toxicology*. 2015;337:47-57.

44. Cano-Sánchez J, Murillo-González FE, de Jesús-Aguilar J, Cabañas-Cortés MA, Tirado-Garibay AC, Elizondo G. The Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole Promotes Estrogen Receptor Alpha and c-Fos Protein Degradation and Inhibits MCF-7 Cell Proliferation and Migration. *Pharmacology*. 2023;108(2):157-65.

45. Großkopf H, Walter K, Karkossa I, von Bergen M, Schubert K. Non-Genomic AhR-Signaling Modulates the Immune Response in Endotoxin-Activated Macrophages After Activation by the Environmental Stressor BaP. *Front Immunol*. 2021;12:620270.

46. Choi EY, Lee H, Dingle RW, Kim KB, Swanson HI. Development of novel CH223191-based antagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol*. 2012;81(1):3-11.

47. Han H, Safe S, Jayaraman A, Chapkin RS. Diet-Host-Microbiota Interactions Shape Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production to Modulate Intestinal Homeostasis. *Annu Rev Nutr*. 2021;41:455-78.

48. Szelest M, Walczak K, Plech T. A New Insight into the Potential Role of Tryptophan-Derived AhR Ligands in Skin Physiological and Pathological Processes. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).

49. Schanz O, Chijiwa R, Cengiz SC, Majlesain Y, Weighardt H, Takeyama H, et al. Dietary AhR Ligands Regulate AhRR Expression in Intestinal Immune Cells and Intestinal Microbiota Composition. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).

50. Wincent E, Amini N, Luecke S, Glatt H, Bergman J, Crescenzi C, et al. The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem*. 2009;284(5):2690-6.

51. Song J, Clagett-Dame M, Peterson RE, Hahn ME, Westler WM, Sicinski RR, et al. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):14694-9.

52. Zhao J, Tang C, Nie X, Xi H, Jiang S, Jiang J, et al. Autophagy potentially protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-Dioxin induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Environ Toxicol*. 2016;31(9):1068-79.
53. Zhang C, Yu X, Gao J, Zhang Q, Sun S, Zhu H, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy was activated against 1,4-Benzoquinone-induced apoptosis in HL-60 cells. *Toxicol In Vitro*. 2018;50:217-24.
54. Wang Y, Song M, Wang Q, Guo C, Zhang J, Zhang X, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is activated to protect against AFB(1)-induced kidney damage in mice. *Chem Biol Interact*. 2022;358:109884.
55. Yang YX, Muqit MM, Latchman DS. Induction of parkin expression in the presence of oxidative stress. *Eur J Neurosci*. 2006;24(5):1366-72.
56. Bae YJ, Park KS, Kang SJ. Genomic organization and expression of parkin in *Drosophila melanogaster*. *Exp Mol Med*. 2003;35(5):393-402.
57. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
58. Hernandez-Martinez JM, Forrest CM, Darlington LG, Smith RA, Stone TW. Quinolinic acid induces neuritogenesis in SH-SY5Y neuroblastoma cells independently of NMDA receptor activation. *Eur J Neurosci*. 2017;45(5):700-11.
59. West AB, Kapatios G, O'Farrell C, Gonzalez-de-Chavez F, Chiu K, Farrer MJ, et al. N-myc regulates parkin expression. *J Biol Chem*. 2004;279(28):28896-902.
60. Lafita-Navarro MC, Kim M, Borenstein-Auerbach N, Venkateswaran N, Hao YH, Ray R, et al. The aryl hydrocarbon receptor regulates nucleolar activity and protein synthesis in MYC-expressing cells. *Genes Dev*. 2018;32(19-20):1303-8.
61. Périer RC, Praz V, Junier T, Bonnard C, Bucher P. The eukaryotic promoter database (EPD). *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):302-3.
62. Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*. 2002;18(2):333-4.

63. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011;7:539.
64. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
65. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Web Server issue):W214-20.
66. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D638-d46.
67. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
68. Edelheit O, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol.* 2009;9:61.
69. Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A, et al. TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D108-10.
70. Wihlén B, Ahmed S, Inzunza J, Matthews J. Estrogen receptor subtype- and promoter-specific modulation of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription. *Mol Cancer Res.* 2009;7(6):977-86.
71. Pansoy A, Ahmed S, Valen E, Sandelin A, Matthews J. 3-methylcholanthrene induces differential recruitment of aryl hydrocarbon receptor to human promoters. *Toxicol Sci.* 2010;117(1):90-100.
72. Lo R, Matthews J. High-resolution genome-wide mapping of AHR and ARNT binding sites by ChIP-Seq. *Toxicol Sci.* 2012;130(2):349-61.

73. Gade P, Kalvakolanu DV. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. *Methods Mol Biol.* 2012;809:85-104.
74. Lu Y, Ding W, Wang B, Wang L, Kan H, Wang X, et al. Positive regulation of human PINK1 and Parkin gene expression by nuclear respiratory factor 1. *Mitochondrion.* 2020;51:22-9.
75. Bouman L, Schlierf A, Lutz AK, Shan J, Deinlein A, Kast J, et al. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* 2011;18(5):769-82.
76. Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ, et al. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(39):16259-64.
77. Siswanto FM, Mitsuoka Y, Nakamura M, Oguro A, Imaoka S. Nrf2 and Parkin-Hsc70 regulate the expression and protein stability of p62/SQSTM1 under hypoxia. *Sci Rep.* 2022;12(1):21265.
78. Ham S, Lee YI, Jo M, Kim H, Kang H, Jo A, et al. Hydrocortisone-induced parkin prevents dopaminergic cell death via CREB pathway in Parkinson's disease model. *Sci Rep.* 2017;7(1):525.
79. Sun X, Liu J, Crary JF, Malagelada C, Sulzer D, Greene LA, et al. ATF4 protects against neuronal death in cellular Parkinson's disease models by maintaining levels of parkin. *J Neurosci.* 2013;33(6):2398-407.
80. He Q, Li Z, Meng C, Wu J, Zhao Y, Zhao J. Parkin-Dependent Mitophagy is Required for the Inhibition of ATF4 on NLRP3 Inflammasome Activation in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Cells.* 2019;8(8).
81. Demmings MD, Petroff GN, Tarnowski-Garner HE, Cregan SP. ATF4 regulates neuronal death in models of Parkinson's Disease. *bioRxiv.* 2019:783795.
82. Terashima J, Tachikawa C, Kudo K, Habano W, Ozawa S. An aryl hydrocarbon receptor induces VEGF expression through ATF4 under glucose deprivation in HepG2. *BMC Mol Biol.* 2013;14:27.
83. Nothdurft S, Thumser-Henner C, Breitenbücher F, Okimoto RA, Dorsch M, Opitz CA, et al. Functional screening identifies aryl hydrocarbon receptor as suppressor of lung cancer metastasis. *Oncogenesis.* 2020;9(11):102.

84. Jagannathan L, Jose CC, Tanwar VS, Bhattacharya S, Cuddapah S. Identification of a unique gene expression signature in mercury and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin co-exposed cells. *Toxicol Res (Camb)*. 2017;6(3):312-23.
85. Fehsel K, Schwanke K, Kappel BA, Fahimi E, Meisenzahl-Lechner E, Esser C, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by clozapine induces preadipocyte differentiation and contributes to endothelial dysfunction. *J Psychopharmacol*. 2022;36(2):191-201.
86. Read A, Schröder M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)*. 2021;10(5).
87. Guan B-J, Krokowski D, Majumder M, Schmotzer CL, Kimball SR, Merrick WC, et al. Translational control during endoplasmic reticulum stress beyond phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(18):12593-611.
88. Duan Z, Zhao J, Fan X, Tang C, Liang L, Nie X, et al. The PERK-eIF2 α signaling pathway is involved in TCDD-induced ER stress in PC12 cells. *Neurotoxicology*. 2014;44:149-59.
89. Cribb AE, Peyrou M, Muruganandan S, Schneider L. The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug Metab Rev*. 2005;37(3):405-42.
90. Wang M-G, Fan R-F, Li W-H, Zhang D, Yang D-B, Wang Z-Y, et al. Activation of PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP axis triggered by excessive ER stress contributes to lead-induced nephrotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2019;1866(4):713-26.
91. Unkila M, Pohjanvirta R, Tuomisto J. Biochemical effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995;27(5):443-55.
92. Wan C, Liu J, Nie X, Zhao J, Zhou S, Duan Z, et al. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin (TCDD) induces premature senescence in human and rodent neuronal cells via ROS-dependent mechanisms. *PLoS One*. 2014;9(2):e89811.

93. Ghiboub M, Verburgt CM, Sovran B, Benninga MA, de Jonge WJ, Van Limbergen JE. Nutritional Therapy to Modulate Tryptophan Metabolism and Aryl Hydrocarbon-Receptor Signaling Activation in Human Diseases. *Nutrients*. 2020;12(9).
94. Dabir P, Marinic TE, Krukovets I, Stenina OI. Aryl hydrocarbon receptor is activated by glucose and regulates the thrombospondin-1 gene promoter in endothelial cells. *Circ Res*. 2008;102(12):1558-65.
95. Chen KG, Kang RR, Sun Q, Liu C, Ma Z, Liu K, et al. Resveratrol ameliorates disorders of mitochondrial biogenesis and mitophagy in rats continuously exposed to benzo(a)pyrene from embryonic development through adolescence. *Toxicology*. 2020;442:152532.
96. Arenas-Huertero F, Zaragoza-Ojeda M, Sánchez-Alarcón J, Milić M, Šegvić Klarić M, Montiel-González JM, et al. Involvement of Ahr Pathway in Toxicity of Aflatoxins and Other Mycotoxins. *Front Microbiol*. 2019;10:2347.
97. Guo C, Liu Y, Wang Y, Wang Q, Huo S, Zhang X, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is activated to protect against AFB(1)-induced immunosuppression in mice spleen. *Toxicol Lett*. 2022;366:33-44.
98. Park H, Jin UH, Karki K, Jayaraman A, Allred C, Michelhaugh SK, et al. Dopamine is an aryl hydrocarbon receptor agonist. *Biochem J*. 2020;477(19):3899-910.
99. Nohara K, Ao K, Miyamoto Y, Ito T, Suzuki T, Toyoshiba H, et al. Comparison of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 gene expression profile in lymphocytes from mice, rats, and humans: most potent induction in humans. *Toxicology*. 2006;225(2-3):204-13.
100. Lorenzin F, Benary U, Baluapuri A, Walz S, Jung LA, von Eyss B, et al. Different promoter affinities account for specificity in MYC-dependent gene regulation. *Elife*. 2016;5.
101. Morales-Hernández A, Corrales-Redondo M, Marcos-Merino JM, González-Rico FJ, Sánchez-Martín FJ, Merino JM. AhR-dependent 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology*. 2016;56:55-63.

102. Sánchez-Martín FJ, Fernández-Salguero PM, Merino JM. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in neural growth factor (NGF)-differentiated pheochromocytoma PC12 cells. *Neurotoxicology*. 2010;31(3):267-76.
103. Sánchez-Martín FJ, Fernández-Salguero PM, Merino JM. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse. *J Neurochem*. 2011;118(1):153-62.
104. Morales-Hernandez A, Sanchez-Martin FJ, Hortigon-Vinagre MP, Henao F, Merino JM. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis by disruption of intracellular calcium homeostasis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Apoptosis*. 2012;17(11):1170-81.
105. Yu AR, Jeong YJ, Hwang CY, Yoon KS, Choe W, Ha J, et al. Alpha-naphthoflavone induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress via c-Src-, ROS-, MAPKs-, and arylhydrocarbon receptor-dependent pathways in HT22 hippocampal neuronal cells. *Neurotoxicology*. 2019;71:39-51.
106. Chen JC, Wu ML, Huang KC, Lin WW. HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression. *Cardiovasc Res*. 2008;80(1):138-50.
107. Gundu C, Arruri VK, Sherkhane B, Khatri DK, Singh SB. GSK2606414 attenuates PERK/p-eIF2 α /ATF4/CHOP axis and augments mitochondrial function to mitigate high glucose induced neurotoxicity in N2A cells. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*. 2022;3:100087.
108. Dey S, Baird TD, Zhou D, Palam LR, Spandau DF, Wek RC. Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response. *J Biol Chem*. 2010;285(43):33165-74.
109. Thornley JA, Trask HW, Ridley CJ, Korc M, Gui J, Ringelberg CS, et al. Differential regulation of polysome mRNA levels in mouse Hepa-1C1C7 cells exposed to dioxin. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(7):1457-67.
110. Pyun DH, Kim TJ, Kim MJ, Hong SA, Abd El-Aty AM, Jeong JH, et al. Endogenous metabolite, kynurenic acid, attenuates nonalcoholic fatty liver disease via AMPK/autophagy- and AMPK/ORP150-mediated signaling. *J Cell Physiol*. 2021;236(7):4902-12.

111. Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE, Zhao B. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci.* 2011;124(1):1-22.
112. Guyot E, Chevallier A, Barouki R, Coumoul X. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov Today.* 2013;18(9-10):479-86.
113. Nuti R, Gargaro M, Matino D, Dolciami D, Grohmann U, Puccetti P, et al. Ligand binding and functional selectivity of L-tryptophan metabolites at the mouse aryl hydrocarbon receptor (mAHR). *J Chem Inf Model.* 2014;54(12):3373-83.