

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Arülsüsivesinike retseptori agonisti ja antagonisti mõju pankrease vähirakuliinide  
geeniekspressioonile ja valgu tasemetele**

Bakalaureusetöö

12EAP

Kirill Matiitšin

Juhendajad:

PhD Lilian Kadaja-Saarepuu

PhD Indrek Teino

TARTU 2024

## **„Arüülsüivesinike retseptori agonisti ja antagonist mõju pankrease vähirakuliinide geeniekspressioonile ja valgu tasemetele“**

Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on transkriptsioonifaktor, mis on oluline keskkonnakemikaalide lagundamisel. AHR-i üles regulatsiooni on täheldatud mitmetes inimese kasvajat, sealhulgas pankreasejuha adenokartsinoomis (PDAC).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida AHR-i agonisti ja antagonist mõju arüülsüivesinike retseptori ja selle märklaudgeenide ekspressioonile ja valgu tasemetele Su86.86 ja BxPc-3 pankrease vähirakuliinides. Tulemused näitasid, et AHR indutseerib nendes rakuliinides nii oma märklaudgeenide kui ka *COX2* ekspressiooni. Eksperimentide tulemusena selgus, et PDAC rakuliinides mõjutab AHR-i inhibiitor vähesel määral ka *MMP1* ja *PTGER4* ekspressiooni tasemeid. Antud geene on varasemalt seostatud vähirakkude invasiivsuse ja migratsiooniga, kuid ka suhtluses immuunrakkudega.

**Märksõnad:** arüülsüivesinike retseptor, inimese pankreasejuha adenokartsinoom, *COX2*, *PTGER2*, *PTGER4*

**CERCS kood:** B220 Geneetika, tsütogeneetika; B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia.

## **„Effects of aryl hydrocarbon receptor agonist and antagonist on gene expression and protein levels in pancreatic cancer cell lines“**

The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a transcription factor that plays a crucial role as a sensor of environmental chemicals. AHR upregulation has been observed in several human tumours, including pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).

The aim of this Bachelor's thesis was to investigate the impact of AHR agonists and antagonists on gene and protein expression in Su86.86 and BxPc-3 pancreatic cancer cell lines. The results demonstrate that AHR positively regulates the expression of its classical target genes as well as *COX2*. In addition, the inhibition of AHR activity has a minor effect on *MMP1* and *PTGER4* mRNA levels. These genes have previously been linked to alterations in cancer cell invasiveness and migration but also to crosstalk with immune cells.

**Keywords:** aryl hydrocarbon receptor, human pancreatic ductal adenocarcinoma, *COX2*, *PTGER2*, *PTGER4*

**CERCS code:** B220 Genetics, cytogenetics; B200 Cytology, oncology, carcinology.

## SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Arüülsüivesinike retseptor .....	8
1.1.1 Arüülsüivesinike retseptori struktuur .....	8
1.1.2 Arüülsüivesinike retseptori signaalirada .....	8
1.1.3. Arüülsüivesinike retseptori funktsioon organismis .....	10
1.1.4. Arüülsüivesinike retseptori ligandid .....	10
1.1.5. Tsütokroom P450 ensüümide roll metabolismis .....	11
1.2. Pankreas.....	12
1.2.1. Pankrease anatoomia .....	12
1.2.2. Inimese pankreasejuha adenokartsinoom.....	13
1.3. Arüülsüivesinike retseptor ja kasvajak.....	13
1.3.1. Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon kasvajates .....	13
1.3.2. Arüülsüivesinike retseptor ja kasvajarakkude apoptoosi inhibeerimine ..	14
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	16
2.1 Töö eesmärgid .....	16
2.2 Materjal ja meetodika .....	16
2.2.1 Inimese pankreasevähi rakuliinide kasvatamine .....	16
2.2.2 RNA eraldamine .....	16
2.2.3 Pöördtranskriptsiooni reaktsioon .....	17
2.2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR).....	17
2.2.5 SDS-PAGE ja Western blot analüüs .....	18
2.2.6 Andmete statistiline analüüs.....	19
2.3 Tulemused ja arutelu .....	20
2.3.1. Arüülsüivesinike retseptori aktiveerimise ja inhibeerimise mõju selle ekspressioonile PDAC rakuliinides .....	20
2.3.2. Arüülsüivesinike retseptori klassikaliste sihtmärkgeenide ekspressioon PDAC rakuliinides pärast töötlust AHR-i aktivaatori või inhibiitoriga .....	22
2.3.3. AHR-i agonisti ja antogonisti mõju MMP1 ekspressioonile .....	23
2.3.4. AHR-i agonisti ja antogonisti mõju COX2 ekspressioonile .....	24
2.3.5. AHR-i agonisti ja antogonisti mõju PGE2 retseptorite ekspressioonile .....	26
KOKKUVÕTE .....	28
SUMMARY .....	29
KIRJANDUSE LOETELU.....	31
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	37

LISAD .....	38
Lisa 1. qPCR-is kasutatud oligonukleotiidid .....	38
LIHTLITSENTS .....	39

## KASUTATUD LÜHENDID

AHR	arüülsüivesinike retseptor ( <i>aryl hydrocarbon receptor</i> )
AHRR	arüülsüivesinike retseptori repressor ( <i>aryl hydrocarbon receptor repressor</i> )
ARNT	arüülsüivesinike retseptori tuuma translokaator ( <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> )
BaP	benso[a]püreen ( <i>benzo[a]pyrene</i> )
bHLH	aluseline heeliks-ling-heeliks motiiv ( <i>basic helix-loop-helix</i> )
COX2	tsüklooksügenaas 2 ( <i>cyclooxygenase 2</i> )
CYP	tsütokroom P450 valk ( <i>cytochrome P450 protein</i> )
HAH	halogeenitud aromaadne süivesinik ( <i>halogenated aromatic hydrocarbon</i> )
HSP90	kuumašoki valk 90 ( <i>heat shock protein 90</i> )
IL	interleukiin ( <i>interleukin</i> )
KYN	L-künureniin ( <i>L-kynurenine</i> )
MMP1	maatriks metalloproteinaas 1 ( <i>matrix metalloproteinase 1</i> )
NES	tuuma ekspordi signaal ( <i>nuclear export signal</i> )
NF-kB	aktiveeritud B-rakkude tuumafaktor kappa-kerge ahela võimendaja ( <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
NLS	tuuma lokalisatsiooni signaal ( <i>nuclear localization signal</i> )
PAH	polütsükliiline aromaadne süivesinik ( <i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i> )
PAS	Per-ARNT-Sim ( <i>Period/ARNT/Single-Minded</i> )
PDAC	pankreasejuha adenokartsinoom ( <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> )
PGE2	Prostaglandiin E2
PTGER2	Prostaglandiin E retseptor 2 ( <i>prostaglandin E receptor 2</i> )
PTGER4	Prostaglandiin E retseptor 4 ( <i>prostaglandin E receptor 4</i> )
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
S100A9	S100 kaltsiumiga seonduv valk A9 ( <i>S100 calcium binding protein A9</i> )
SDS-PAGE	naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geelelektroforees ( <i>sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
TAD	transaktivatsiooni domeen ( <i>transactivation domain</i> )
TBP	TATA-seonduv valk ( <i>TATA-box binding protein</i> )
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenso-p-dioksiin ( <i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i> )
TGF- $\alpha$	transformeeriv kasvufaktor alfa ( <i>transforming growth factor alpha</i> )

TGF- $\beta$	transformeeriv kasvufaktor beeta ( <i>transforming growth factor beta</i> )
XAP2	B-hepatiidi viiruse X-seoseline valk 2 ( <i>Hepatitis B virus X-associated protein 2</i> )
XRE	ksenobiootikumi vastuselement ( <i>xenobiotic response element</i> )

## SISSEJUHATUS

Pankreasejuha adenokartsinoom (PDAC) on kõhunäärme kõige levinum vähitüüp. PDAC on varases staadiumis sageli asümptomaatiline ja resistentne ravile, sellepärast on haigusesse suremus kõrge. Kuna PDAC on vastupidav tavapärastele vähiravi meetoditele nagu kemoterapia ja kiiritusravi, siis otsitakse aina rohkem uusi meetodeid selle kasvaja raviks.

Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on ligandi poolt aktiveeriv transkriptsioonifaktor. AHR on erinevate keskkonnakemikaalide, näiteks polütsükliiliste ja halogeensete süivesinike mõjude vahendaja. Need kemikaalid, näiteks kartsinogeen TCDD, mis on AHR-i aktiveeriv ühend, omavad toksilist mõju. AHR-i tase on inimese organites ja kudedes varieeruv ning võib sõltuda ka seda aktiveerivast ligandist. Enamjaolt on AHR-i hulk erinevates kasvajatüüpides kõrgeks muutunud ning on leitud, et AHR-i aktiivsuse inhibeerimine vähendab kasvajakude invasiivsust, proliferatsiooni ja migratsiooni, kuigi on andmeid ka vastupidise kohta mõningate vähitüüpide puhul.

Tsüklooksügenaas 2 (COX2) on valk, mis osaleb kasvajakude apoptoosi vältimises ning suhtluses immuunrakkudega. COX2 osaleb COX2/PGE2/PTGER signaalirajas, mis omab olulist rolli vähi arengul. Seda signaalirada, nagu ka maatriks metalloproteinaas 1 (MMP1) puhul, on seostatud kasvajakude proliferatsiooniga, ellujäämisega, angiogeneesi ja invasiooni soodustamisega. COX2/PGE2/PTGER2 raja moduleerimist on uuritud kui potentsiaalselt terapeutilist strateegiat vähiravis.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida AHR-i agonisti ja antagonistide mõju arüülsüivesinike retseptori geeniekspressioonile ja valgus tasemele Su86.86 ja BxPc-3 pankrease vähirakuliinides. Lisaks määrati AHR-i aktiivsuse muutmise toime erinevate sihtmärkgeenide ekspressioonile.

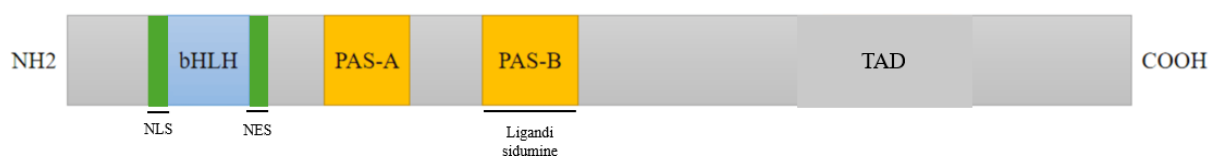
## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1 Arüülsüivesinike retseptor

#### 1.1.1 Arüülsüivesinike retseptori struktuur

Inimese arüülsüivesinike retseptori (*aryl hydrocarbon receptor*, AHR) geen asub 7. kromosoomis ja koosneb 11 eksonist, millelt saab transkribeerida 6243 aluspaari pikkuse mRNA (Ensembl). AHR-i valk koosneb 848 aminohappe jäägist ja selle molekulmass on 96 kDa. (Uniprot). AHR kuulub transkriptsioonifaktorite perekonda, kuhu kuulub 19 valku, mille hulgas on lisaks AHR-ile ka AHR-i tuuma translokaator ARNT ja repressor AHRR (NCBI). Nendele valkudele on omased kolm sarnast domeeni: N-terminaalses osas on aluseline heeliks-ling-heeliks (bHLH) motiiv, Per-ARNT-Sim (PAS) domeen ja C-terminaalses osas on vähem konserveerunud transaktivatsiooni domeen (TAD). Enamik bHLH/PAS valke on võimelised moodustama homo- või heterodimeere ja on aktiivsed dimeerses olekus (Furness *Cyp.*, 2007; Larigot *et al.*, 2018).

AHR-i bHLH regioonis asuvad tuuma lokaliseerimise signaal (NLS) ja tuuma ekspordimise signaal (NES), mis on vajalikud transpordiks tuuma ja tsütoplasmasse (Joonis 1) (Ikuta *et al.*, 1998). Heeliks-ling-heeliks domeen osaleb inaktiivse AHR-i interaktsioonides tšaperonidega, dimeriseerumisel ARNT-ga ja seondumisel DNA-ga. AHR-i valgus on kaks PAS-domeeni. PAS-A osaleb dimeriseerumisel ning PAS-B ligandiga seondumisel ja interaktsioonides tšaperonidega (Monostory *et al.*, 2009). Transaktivatsiooni domeen (TAD) vastutab sihtgeenide aktiveerimise ja kofaktorite seondumise eest (Teino *et al.*, 2020). C-terminaalses domeenis asuvad kolm aladomeeni: happeliste aminohappejääkide glutamaadi ja asparaadi rohke piirkond, glutamiinirikas ala ja piirkond, kus esineb palju seriini, treoniini ja proliini (Larigot *et al.*, 2018).

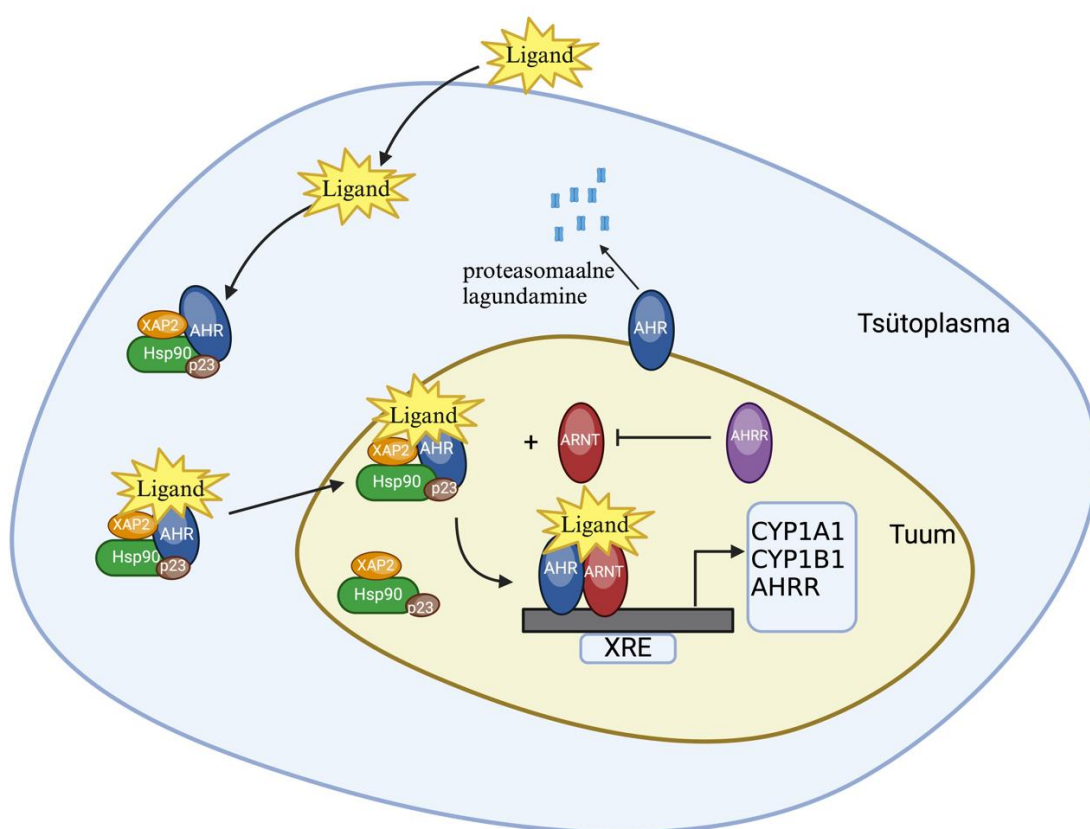


Joonis 1. Inimese AHR-i valgust skeem. Kohandatud Larigot *et al.*, (2018) järgi.

#### 1.1.2 Arüülsüivesinike retseptori signaalirada

AHR on ligandi poolt aktiveeriv transkriptsioonifaktor, mis on funktsionaalselt aktiivne, kui moodustab heterodimeeri transkriptsioonifaktoriga ARNT. Inaktiivne AHR asub tsütoplasmas

kompleksis tšaperonidega. Sellesse kompleksi kuuluvad kuumašoki valgu 90 (HSP90) dimeer, 23 kDa valk p23 (*co-chaperon p23*), B-hepatiidi viiruse X-seoseline valk 2 (*Hepatitis B Virus X-associated protein 2; XAP2*) (Joonis 2). Kui ligand läbib rakumembraani, seondub see AHR-iga. See võimaldab ligand-retseptor kompleksi translokatsiooni tuuma ja seal selle dissotsieerumist. AHR on aktiivne, kui moodustab tuumas heterodimeeri transkriptsioonifaktoriga ARNT. See kompleks kontrollib sihtrakkude geenide avaldumist, seondudes ksenobiootikumide vastuselementidele (XRE). Seejärel toimub AHR-i eksport tsütoplasmasse, kus see ubiquitinüleeritakse ja degradeeritakse proteasoomis (Larigot *et al.*, 2018).



**Joonis 2. AHR-i klassikaline signaalirada.** Kohandatud Stockinger *et al.*, (2014) järgi.

AHR-ARNT dimeer seondub ka AHRR-i promootorile indutseerides selle geeni ekspressiooni. AHRR omakorda seondub ARNT-iga, mille tagajärjel transporditakse monomeerne AHR tuumast välja ning lagundatakse, pärssides sellega AHR-sõltuva transkriptsiooni aktiveerimist. Samuti seondub transkriptsiooniliselt mitteaktiivne AHRR-ARNT dimeer XRE järjestusega, vaigistades sellega AHR-i poolt indutseeritud geeniekspressiooni (Sakurai, 2017).

### 1.1.3. Arüüsüsivesinike retseptori funktsioon organismis

AHR-i ekspressioonitase on inimese organites ja kudedes varieeruv. Kõige rohkem on märgatud kõrget AHR-i ekspressioonitaset maksa-, neeru- ja kopsurakkudes, kuid seda leidub ka vähesel määral pankrease ja silma rakkudes (Human Protein Atlas). AHR-i ekspressioonil omavad rolli tsütokiinid TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) ja IL-4 (interleukiin 4) (Wolff *et al.*, 2001). TGF- $\beta$  indutseerib AHR-i transkriptsiooni (Abel *et al.*, 2010). Lisaks on AHR-i regulatsiooniga seotud Wnt/ $\beta$ -kateniini signaalirada (Moreno-Marin *et al.*, 2018). AHR geeniekspressiooni mõjutavad ka epigeneetilised mehhanismid, mille käigus metüleeritakse CpG-saartes DNA-d (Mulero-Navarro ja Fernandez-Salguero, 2016).

Algselt tuvastati AHR erinevate keskkonnakemikaalide, näiteks polütsükliiliste ja halogeensete süsivesinike mõjude vahendajana. Need kemikaalid aktiveerivad AHR-i, mis omakorda indutseerib mitmete ksenobiootikumide metaboliseerivate ensüümide, näiteks P450 perekonda kuuluvaid CYP1A1, CYP1A2 ja CYP1B1, ekspressiooni, mis on AHR-i sihtmärkgeenid (Mandal, 2005). Hiljem on tõestatud, et AHR osaleb ka erinevate endogeensete ühendite signalisatsioonis (Hubbard *et al.*, 2015). Lisaks on AHR-i tähtsust rõhutatud ka teistes valdkondades nagu reproduktsioon, maksa homöostaas ja immuunsüsteem. AHR mõjutab rakkude migratsiooni, adhesiooni ja vastutab ka mitme erineva protsessi eest nii embrüonaalses arengus kui ka täiskasvanueas (Nebert, 2017). Näiteks on inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel täheldatud muutusi AHR-i ekspressioonis, mis viitab AHR-i kui transkriptsioonifaktori olulisusele pluripotentsetes tüvirakkudes. Lisaks on AHR-il tähtis roll rakutsükli ja apoptoosi reguleerimisel (Teino *et al.*, 2020).

### 1.1.4. Arüüsüsivesinike retseptori ligandid

Inaktiivse tsütoplasmas oleva AHR-i aktivatsiooniks ja tsäperonidest vabanemiseks on vaja ligandi seondumist AHR-iga. Üks esimesi identifitseeritud AHR-i ligande oli TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibensio-p-dioksiin), mis suurendab CYP1A1 ja CYP1B1 ekspressiooni (Joonis 2) (Poland *et al.*, 1976). AHR-i ligandid on tavaliselt kõrge afiinsusega ning kuuluvad suitsus leiduvate polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike (PAH) või halogeenitud aromaatsete süsivesinike (HAH) hulka (Denison ja Pandindi, 2002). PAH-id on sagedasti esinevad AHR-i ligandide klass, mis tekivad orgaaniliste ainete mittetäielikul põlemisel (Cavallo *et al.*, 2019). Paljudega neist puututakse igapäevaselt kokku erinevate sõiduvahendite (sh meretransport),

heitgaaside ja samuti toidu kaudu. Tavaliselt sisaldavad toiduained vähesel määral PAH-e. Grillitud või praetud toidud sisaldavad suurtes kogustes PAH-e (Larsen *et al.*, 2002). TCDD on näide AHR-i ligandist, mis kuulub HAH-ide hulka (Teino *et al.*, 2020). Lisaks sellele on näidatud, et AHR-i sihtmärkgeenide ja sellega seotud füsioloogiliste protsesside muutumine sõltub nii AHR-i ligandist kui ka koest (Nault *et al.*, 2013).

Mitmed AHR-i ligandid omavad toksilist mõju, näiteks kartsinogeen TCDD, mis põhjustab sünnidefekte, südame ja veresoonehaigusi (Mandal, 2005). Peale selle on veel endogeensed ligandid, mida toodetakse raku poolt või saadakse toitainete lagundamisel. Endogeensete ligandide puhul ekspresseeruvad teised sihtmärkgeenid ja need ligandid metaboliseeritakse kiiresti, takistades nende ühendite bioakumuleerumist, mistõttu puudub neil tugev toksiline efekt. AHR-i endogeensete ligandide hulka kuuluvad künureiin (KYN), ITE (2-(1' H-indool-3'-karbonüül)-tiasool-4-karboksüülhappe metüül ester) (Denison ja Nagy, 2003). Nii künureiin kui ka teised endogeensed ligandid nagu näiteks indigo, indirubiin, dopamiin ja serotoniin on aminohappe trüptofaani metaboliidid (Park *et al.*, 2020).

AHR-i antagonistid on ühendid, mis takistavad AHR-iga seondudes viimase tuuma liikumist ja tema sihtmärkgeenide aktivatsiooni (Nguyen *et al.*, 2015). On teada, et antagonistid tavaliselt inhibeerivad TCDD-sõltuvat AHR sihtmärkgeenide aktiveerimist nagu CYP1A1 ja CYP1B1 (Joonis 2) (Teino *et al.*, 2020). Antud töö puhul kasutati antagonistina BAY241694, mis on hetkel kliinilises uuringus kui potentsiaalne suukaudne kasvajakasvavastane ravim (Clinical Trials).

#### **1.1.5. Tsütokroom P450 ensüümide roll metabolismis**

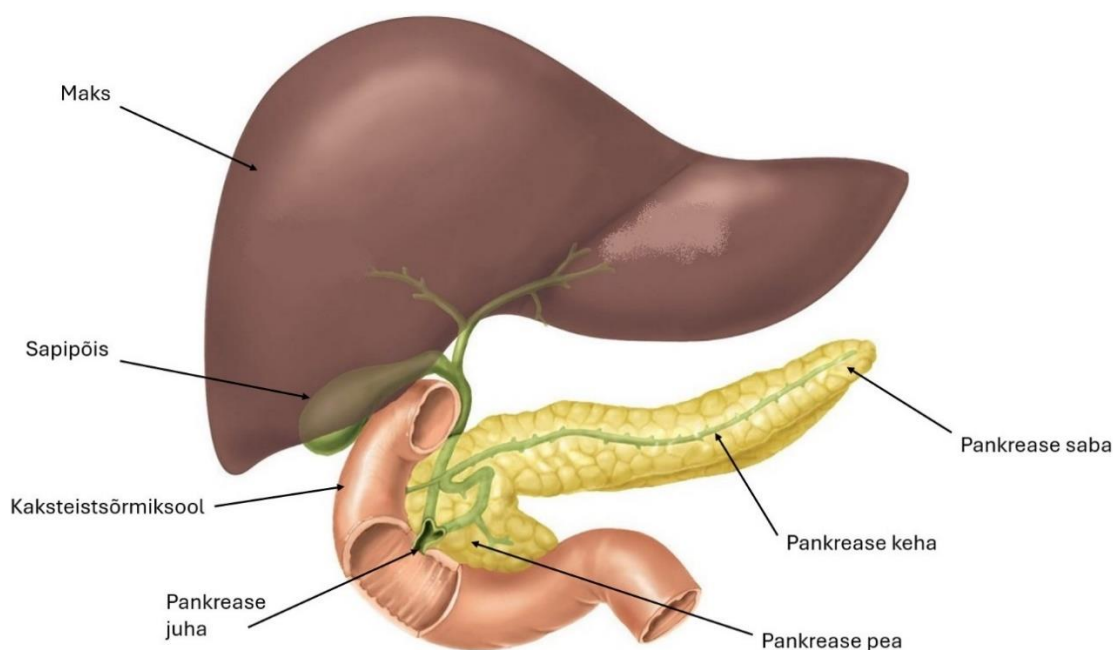
CYP1A1 on üks peamine tsütokroom P450 perekonna (CYP) ensüüm, mis osaleb erinevate toksiliste ainete metabolismis. CYP-id on I ja II faasi metabolismi ensüümid (McDonnell ja Dang 2013). On teada, et pidev kokkupuude sisse hingavate kemikaalide ja keskkonnakantserogeenidega suurendab CYP1A1 ekspressiooni taset läbi AHR-i (Androustopoulos *et al.*, 2009). Tsütokroom P450 perekonda kuuluvad ensüümid katalüüsivad aromaatsete ühendite hüdroksüülimist ja oksüdeerimist (McDonnell ja Dang 2013). Nende üheks substraadiks on kopsuvähki tekitav benzo[a]püreeni (BaP), mis kuulub PAH-ide hulka. PAH-id on lipofiilsed ja läbivad rakumembraani passiivse difusiooni teel ning tsütoplasmasse jõudes seonduvad nad AHR-iga, mille tõttu liigub see tuuma misjärel tõuseb CYP-geenide ekspressioon (Shimada *et al.*, 2006). Lisaks sellele on CYP-ensüümidel peroksüdaasne aktiivsus, mis katalüüsib BaP oksüdeerimist, mille tulemusel tekivad reaktiivsed katioonid, mis

on võimelised seonduma DNA-ga, põhjustades sellel kaheaheelisi katkeid (Ma, 2001). PAH-e peetakse prekartsinogeenseteks ühenditeks, mis tähendab, et need ise ei oma otseselt kartsinogeenset efekti, kuid nendest metabolismi käigus moodustunud uued molekulid on võimelised tekitama DNA mutatsioone (Shimada ja Fujii-Kuriyama, 2004). PAH-ide aktivatsioonil mängib olulist rolli CYP1A1, samas kui detoksifikatsioonil osaleb CYP1A2. Peale selle bioaktiveerib CYP1B1 ka selektiivselt PAH-e vaheühenditeks, mis reageerivad DNA-ga. CYP1A1, CYP1A2 ja CYP1B1 on AHR-i sihtmärkgeenid ja seetõttu need head hindamaks AHR-i aktivatsiooni ja inhibitsiooni (Moorthy *et al.*, 2015).

## 1.2. Pankreas

### 1.2.1. Pankrease anatoomia

Pankreas ehk kõhunääre on oluline seede- ja hormonaalsüsteemi elund, mis paikneb kõhuõõnes. See on umbes 15 sentimeetrit pikk ja kaalub 70-80 grammi. Pankreas koosneb pankrease peast, keskkohast ehk pankrease kehast ja kitsast sabaosast. Kõhunäärme suurim osa, pea, asetseb kõhuõõnes, mille ümber paikneb kaksteistsõrmiksool (*duodenum*). Pankrease keha paikneb mao taga ning pankrease saba ulatub põrnani. Kogu kõhunäärme ulatuses kulgeb pankreasejuha (*ductus pancreaticus*), mis ühendab pankreast kaksteistsõrmiksoolega (Joonis 3) (Roosalu, 2010).



**Joonis 3. Inimese pankreas ja seda ümbritsevad organid.** Joonis on kohandatud Pandol S. J. raamatu „*The Exocrine Pancreas*“ järgi

Pankreas on organ, millel on nii ekso- kui ka endokriinne funktsioon. Eksokriinne funktsioon vastutab kõhunäärmenõre sekretsiooni eest, mis liigub pankreasejuhast peensoolde. Pankreases endokriinse funktsiooniga on Langerhansi saared, mis koosnevad erinevatest rakutüüpidest nagu alfa-, beeta- ja delta rakkudest. Alfa rakud sünteesivad glükagooni, tõstes sellega veresuhkru taset, samas kui beeta rakud toodavad insuliini, mis reguleerib veresuhkru taset (Wilcox, 2005). Delta rakud toodavad hormooni somatostatiin, mis reguleerib insuliini ja glükagooni tootmist (Kingisepp, 2019).

### **1.2.2. Inimese pankreasejuha adenokartsinoom**

Pankreasejuha adenokartsinoom (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) on kõhunäärme kõige levinum vähitüüp, mis on väga agressiivne ja surmav (Siegel *et al.*, 2020). Pankreasevähi juhtudest on umbes 90% PDAC (Adamska *et al.*, 2017). Aastal 2020 läbiviidud uuringus selgus, et kõhunäärmevähk on maailmas suremuselt seitsmendal kohal, põhjustades aastas 466 003 inimese surma (Sung *et al.*, 2021). Kõrge suremuse põhjuseks on see, et kasvaja on varases staadiumis sageli asümptomaatiline ja vastupidav ravile (Vareedeayah *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2014). Eestis moodustab kõhunäärmevähk 3% kõigist vähijuhtudest (Eesti Vähiliit, 2017. aasta andmed).

### **1.3. Arüülsüsivesinike retseptor ja kasvajakasv**

#### **1.3.1. Arüülsüsivesinike retseptori ekspressioon kasvajakasv**

Inimese kasvajakasv, näiteks rinnavähi, kõhunäärmevähi ning pea- ja kaelakartsinoomi puhul on täheldatud seda, et AHR-i ekspressioon on suurenenud (DiNatale *et al.*, 2011; Koliopanos *et al.*, 2002; Novikov *et al.*, 2016), kuid AHR-i ekspressiooni tase võib erineda sõltuvalt vähitüübist (Guan *et al.*, 2021). Mõnel juhul on suurenenud AHR-i ekspressiooni seostatud ka kasvaja progresseerumisega (Fader *et al.*, 2014). Avaldatud uuringute põhjal saab väita, et AHR-i aktiivsuse inhibeerimine kasvajakasvades viib nende migratsiooni, invasiooni ja metastaseerumise vähenemiseni (Safe *et al.*, 2013). Samuti on leitud, et ka AHR-i aktiveerimine ligandidega nagu näiteks Omeprazole, võib vähendada kasvajakasvade invasiivsust (Jin *et al.*, 2015). Lisaks põhjustab AHR-i aktiveerimine Raloxifeeniga ja Carbidopaga kasvajakasvade proliferatsiooni vähenemist (Ogura *et al.*, 2017). Need tulemused viitavad sellele, et kasvajakasvade ravimeid võib leida nii AHR-i antagonistide kui ka agonistide hulgast, sest AHR-i mõju kasvajakasvadele on nii koe- kui ka ligandispetsiifiline.

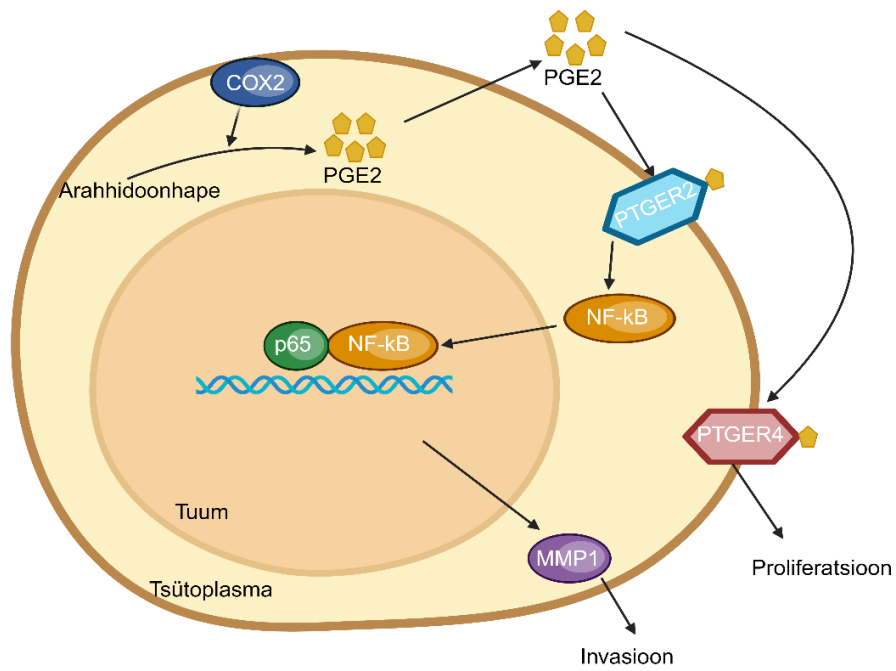
### 1.3.2. Arüülsüivesinike retseptor ja kasvajarakkude apoptoosi inhibeerimine

Suurenenud tsüklooksügenaas 2 (COX2) ekspressiooni taset on seostatud põletikuga ja mitmesuguste kasvajate, sealhulgas rinnavähiga (Dengar *et al.*, 2009). COX2 on valk mis osaleb kasvajarakkude apoptoosi vältimises (Bekki *et al.*, 2015). Tervetes kudedes on COX2 madalalt ekspresseeritud arahhidoonhappe metabolismi ensüüm ja katalüüsib selle konverteerimist prostaglandiiniks E2. COX2 inhibeerib kasvajarakkudes apoptoosi, suurendab invasiivsust ning angiogeneesi (Sobolewski *et al.*, 2010). Globaalses arahhidoonhappe metabolismi teekonnas omavad olulist rolli prostanoidid.

Prostanoidid on parakriinsed reguleerivad faktorid, mis osalevad signaaliülekanDES. Prostanoidide signaalimine koosneb ensümaatilistest moodulist ning retseptormoodulist: Prostaglandiin E retseptor 2 (PTGER2), Prostaglandiin E retseptor 4 (PTGER4) (Ershov *et al.*, 2022). Varasemad uuringud on näidanud, et COX2/PGE2/PTGER2 rada (Joonis 4) omab olulist rolli vähi tekkimisel. Prostaglandiin E2 (PGE2) on bioaktiivne lipiidimolekul, mida reguleerib COX2 ning mis toimib oma retseptorite, nagu PTGER2 kaudu mitmete rakuliste protsesside vahendajana. Antud juhul on see rada seotud raku proliferatsiooni, ellujäämise, angiogeneesi ja invasiooni soodustamisega, mis kõik on vähi progresseerumise tunnused. COX2/PGE2/PTGER2 raja moduleerimist on uuritud kui potentsiaalset terapeutilist strateegiat vähiravis. COX2 aktiivsuse inhibeerimise või PGE2 signaali blokeerimine PTGER2 või tuumafaktor-kappa (NF-kB) antagonistide abil on näidanud lubavaid tulemusi eelkliinilistes uuringutes (Zhang *et al.*, 2019). PTGER4 on G-valguga seotud retseptor, mis vahendab PGE2 toimet, milleks on raku proliferatsioon, invasioon ja tüvirakkude taastumine (Yu *et al.*, 2023).

Lisaks sellele suurendavad AHR-i agonistid maatriksi metalloproteinaas 1 (MMP1) ekspressiooni. See valk osaleb rakuvälise maatriksi lagundamises normaalsetes füsioloogilistes protsessides, samuti haigusprotsessides nagu metastaasid (Tsai *et al.*, 2014). MMP1 ekspressioon korreleerub otseselt NF-kB ekspressiooniga (Nguyen *et al.*, 2015). MMP1 ekspressiooni vähenemine vähendas oluliselt metastaaside teket. Metastaasidel, millel on vähenenud MMP1 ekspressioon on märkimisväärselt vähem proliferatiivseid rakke ning MMP1 ekspressioon on seotud TGF- $\alpha$  vabanemise vähenemisega (Liu *et al.*, 2012)

On oluline märkida, et AHR on võimeline reguleerima immuunregulatiivsete markerite ekspressiooni nagu COX2. Lisaks sellele on varasemalt näidatud, et pankreasevähis on COX2 ekspresseeritud erinevatel tasemetel (Eibl *et al.*, 2003).



**Joonis 4. COX2/PGE2/PTGER2 signaalirada.** Tsüklooksügenaas 2 (COX2) soodustab vähirakkude paljunemist ja invasiooni prostaglandiin E2 (PGE2)/tuumafaktor-kappa B (NF-κB) signaalraja kaudu. Joonis on kohandatud (Zhang *et al.*, 2019) järgi.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö eesmärgid olid:

1. Hinnata arüülsüivesinike retseptori aktiivsuse modulaatorite toimet AHR-ile pankreasevähi rakuliinides Su86.86 ja BxPc-3.
2. Uurida arüülsüivesinike retseptori agonisti ja antagonistide mõju AHR-i märklaudgeenide ekspressioonile Su86.86 ja BxPc-3 rakuliinides.
3. Selgitada arüülsüivesinike retseptori aktivaatori ja inhibiitori mõju *MMP1*, *COX2* ja *PTGER1-4* ekspressioonile pankreasevähi rakuliinides Su86.86 ja Bxpc-3.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Inimese pankreasevähi rakuliinide kasvatamine

Töös kasutati inimese pankrease vähirakuliine Su.86.86 ja BxPc-3 (saadud koostööpartneritelt Leedu Terviseteaduste Ülikoolist). Rakke kasvatati 1x RPMI 1640 söötmes (Corning Inc.), mis sisaldas 10% veise loote seerumit (ingl k *fetal bovine serum* või FBS, Capricorn Scientific) ja 1% penitsilliini-steptomütsiiniga (Corning Inc.). Rakke inkubeeriti 100 mm koekultuuri tassidel ja 6-kannulistel plaatidel (Greiner Bio-One) 37 °C juures ning küllastunud veeauru ja 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas. Rakkudel vahetati söödet vastavalt rakuliini kasvukiirusele, so 2 – 3 päeva järel ning passeeriti trüpsiiniga (Corning Inc.) 3-6 päeva möödumisel. Katsete tegemisel kasutati AHR-i agonisti TCDD (Cambridge Isotope Laboratories) ning AHR-i antagonistide BAY241694 (Bay, MedChemExpress LLC).

#### 2.2.2 RNA eraldamine

Rakkude lüüsiks pesti rakke isotoonilise puhvriga (*phosphate-buffered saline*, PBS) ja lisati FARB lüüsilahus (Favorgen Biotech Corporation), mis sisaldas 1:100 β-merkaptotoetanooli (Alpha Medthrift Scientific Co.). Lüüsuivad rakud kraabiti spaatliga kokku ja tõsteti mikrotoobidesse. Lüsaati säilitati -80 °C juures või jätkati kohe RNA puhastamisega, kasutades *Tissue Total RNA Purification Mini* komplekti (Favorgen Biotech Corporation) järgides

tootjapoolset protokoll. RNA elueeriti nukleasivabas vees lõppmahus 30 µl. RNA kontsentratsiooni ja kvaliteeti määrati seadmega NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

### 2.2.3 Pöördtranskriptsiooni reaktsioon

Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni läbiviimiseks kasutati RevertAid RT komplekti (Thermo Fisher Scientific). Esmalt teostati Dnaas I töötlus lõppmahus 10 µl, mis sisaldas 1000 ng RNA-d, 1 x reaktsioonipuhvrit, 1 RÜ (Rahvusvaheline ühik) Dnaas I ja 10 RÜ RiboLocki ning proove inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures. Seejärel lisati DNAasi inaktiveerimiseks 4,5 mM EDTA-d ning proove inkubeeriti 10 minutit 65 °C juures. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooniks segati kokku segu lõppmahuga 20 µl, mis sisaldas 1 x reaktsioonipuhvrit, 20 RÜ RiboLocki, 1 mM dNTP-d, 5 µM *Random Hexamer* praimerit ja 200 RÜ revertaasi. Pöördtranskriptsiooni reaktsioon viidi läbi 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) masinas ja selleks kasutatud programm on toodud Tabelis 1.

**Tabel 1. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni programm**

	Temperatuur (°C)	Aeg (min)
Aktivatsioon	25	5
cDNA süntees	42	60
Inaktivatsioon	70	10

### 2.2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)

Geeniekspressiooni analüüsiks tehti kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon 384-kannulisel plaadil (Bioplastics) kasutades LightCycler 480 II (Roche) masinat. Reaktsiooni lähteaineteks oli 500 nM *forward* praimerit, 500nM *reverse* praimerit, 5 µl SYBER™ Green/ROX qPCR Master Mix-i (Thermo Fisher Scientific) ja 4 µl cDNA-d ning lõppmahuks oli 10 µl. Negatiivse kontrollina kasutati cDNA asemel vett. Reaktsioonid sooritati triplikaatidena ja analüüsil kasutati nende keskmisi väärtusi. Lävitsükli (*cycle threshold*, Ct) väärtused arvutati LightCycler 480 II programmiga. Väärtused normaliseeriti TBP (*TATA-binding protein*) suhtes. Reaktsiooni produktide spetsiifilisust kontrolliti sulamiskõverate analüüsi põhjal. Kasutatud programm on esitatud Tabelis 2 ning praimerid on toodud Lisas 1. Suhtelise geeniekspressiooni arvutamiseks kasutati Livaki meetodit (Livak ja Scmittgen, 2001).

**Tabel 2. qPCR programm**

	Temperatuur (°C)	Aeg (min)	Tsüklite arv
Esmane denaturatsioon	95	10	1
Denaturatsioon	95	15 sekundit	40
Praimerite seondumine ja elongatsioon	60	1	40
Sulamiskõvera moodustamine	45-95	7	1

### 2.2.5 SDS-PAGE ja *Western blot* analüüs

Rakud koguti koekultuuri tassilt kokku ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 5 min (200 rcf). Rakusade suspendeeriti lüüsimiseks 300 µl-s RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*) puhvril (50 mM Tris pH 7,4, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% SDS), kuhu oli lisatud proteaasi inhibiitorit (Roche). Rakususpensioon asetati pärast lüüsi 1 tunniks jääle ning vorteksiti iga 15 min järel vähemalt 15 sekundit. Rakulüsaat tsentrifuugiti 4 °C juures 10 min (140000 rcf) ning supernatant säilitati -80 °C kapis. 17,5 µl-ile valguproovile lisati 5x laadimispuhvit, 100mM ditiotreitol ning kuumutati 5 min 95 °C juures.

Valglüsaadi proovid 20 µl 10% SDS-polüakrüülamiid-geelelektoriforeesile ning valgud lahutati Mini-PROTEAN® Tetra Cell masianga (Bio-Rad) 45 minutit 50 V ja 1 h 170 V juures. Pärast seda inkubeeriti geeli 5 minutit ülekandepuhvris (192 mM glütsiin, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 10% metanool). Valkude ülekanne geelilt metanooliga aktiveeritud polüvinülideen difluoriid (PVDF) membraanile toimus Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad) masinas 15 min 17 voldiga. Seejärel loputati membraani 10% TBST puhvril (Tris-puhver, Tween-20) ja blokeeriti mittespetsiifiline signaal 5% lõssipulbrit sisaldavas TBST-s ühe tunni vältel. Sellele järgnes membraani inkubeerimine üleöö 4 °C juures primaarsete antikehadega blokeerimispuhvril, millele järgnes 4 x 6 min membraani pesemine TBST lahuses. Sekundaarse antikehaga inkubeeriti membraani 1h toatemperatuuril ja pesti taaskord 4 x 6 min. Valkude visualiseerimiseks kanti membraanile 5 minutiks Immobilon Western Chemiluminescent HRP substraatide segu (Merek Millipore) ja seejärel pilti ilmutati CemiDoc XRS+ süsteemiga (BioRad).

Kasutatud primaarsed antikehad:

- 1) Aktiini vastane hiire monoklonaalne antikeha, sc-47778, 1:10000 (Santa Cruz Biotechnology)
- 2) COX2 vastane hiire polüklaalne antikeha, LS-C339533, 1:5000 (LS Bio)
- 3) AHR-i vastane küüliku polüklaalne antikeha, 28727-1-AP, 1:1000 (Proteintech)

Kasutatud sekundaarsed antikehad:

- 1) mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku vastane hiire antikeha, sc-2357, 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology)
- 2) mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud hiire vastane kitse antikeha, sc-2005, 1:10000 (Santa Cruz Biotechnology)

### **2.2.6 Andmete statistiline analüüs**

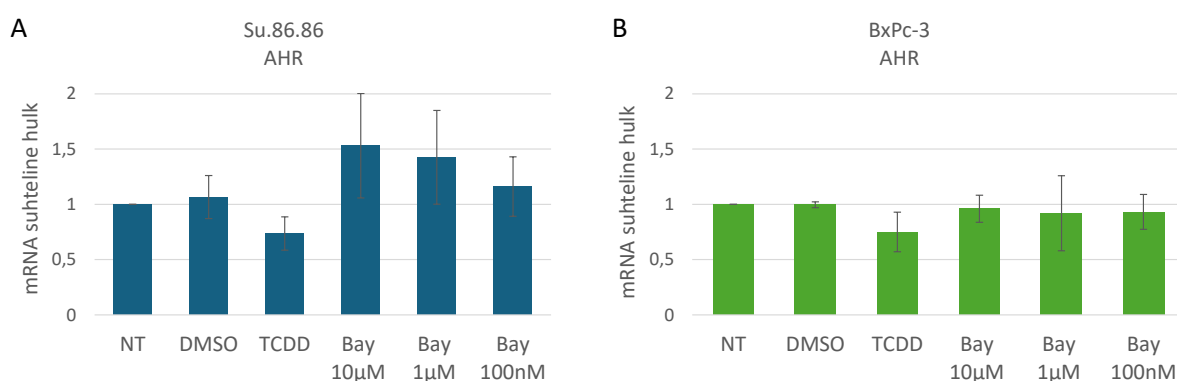
Käes olevas bakalaureusetöös tehti katsed kolmes korduses. *Western blot* ja qPCR-i tulemuste esitamisel kasutati tulemuste keskväärtuseid ning veapiirid tähistavad standardvea väärtuseid. Statistiline olulisus määrati MS Exceli kahepoolse sõltumatu Studenti t-testi abil ja statistilise olulisuse nivooks võeti  $p < 0,05$ . Tulpdiagrammid on koostatud MS Excel-is. *Western bloti* tulemuste analüüsiks ja densitomeetria läbiviimiseks kasutati UVP Biosepctrum 510™ Imaging Systems masinat.

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1. Arüüsivesinike retseptori aktiveerimise ja inhibeerimise mõju selle ekspressioonile PDAC rakuliinides

Käesoleva bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli võrrelda AHR-i ekspressiooni pankreasevähi rakuliinides. Varasemalt on teada, AHR-i ekspresseeritakse vähesel määral mittehaigestunud pankrease koes (Human Protein Atlas). Mitmes pankreasevähi rakuliinis on täheldatud AHR-i ekspressiooni tõusu ning seda väga erinevatel tasemetel (Jin et al., 2015; Ogura et al., 2017). Antud bakalaureusetöös valiti pankreasevähi rakuliinid Su.86.86 ja BxPc-3, kuna eelnevalt meie laboris tehtud uuringud näitasid nendes rakuliinides kõrget AHR-i taset (Konsa,2021). Kasvatatud rakuliine töödeldi agonisti TCDD ja antagonistiga Bay-ga, et selgitada nende mõju AHR-i ekspressiooni tasemele.

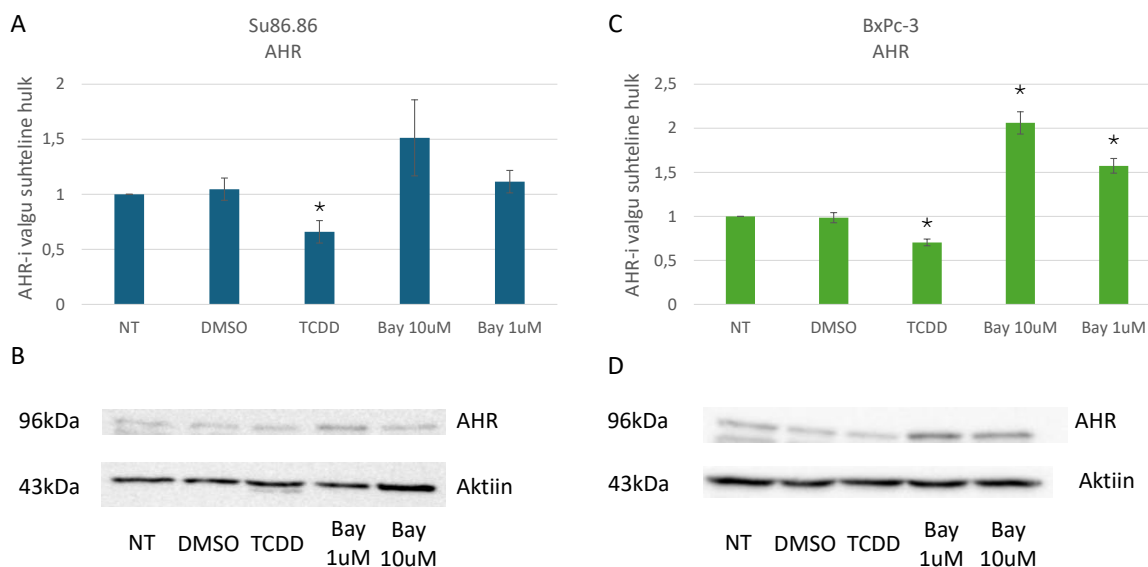
Esmalt uuriti AHR-i agonisti ja antagonistiga mõju selle mRNA ekspressioonile, kasutades RT-qPCR-i. Analüüsi tulemusena selgus, et kuigi Su86.86 rakkudes statistiliselt olulist muutust *AHR*-i tasemeis ei täheldatud, võis märgata mõningast langustrendi TCDD-ga ning tõusutrendi erinevate Bay kontsentratsioonidega (Joonis 5A). Samuti ei olnud BxPc-3 rakuliinis AHR-i aktivatsioonil või inhibitsioonil selle ekspressioonile olulist mõju (Joonis 5B). Antud tulemused on kooskõlas laiemaga teadmise, et AHR-i aktiveerimine ja inhibeerimine ei mõjuta oluliselt selle ekspressiooni.



**Joonis 5. *AHR*-i mRNA ekspressioon PDAC rakuliinides.** Su86.86 (A) ja BxPc-3 (B) rakuliine inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10 μM, 1 μM ja 100nM) juuresolekul 24h. *AHR*-i ekspressiooni määrati RT-qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel eraldi tehtud katsel.

qPCR-i tulemuste kinnitamiseks tehti järgnevalt SDS-PAGE ja *Western blot* analüüs, kasutades AHR-i ja aktiini vastaseid antikehasid. Tulemuste kvantifitseerimiseks tehti densitomeetria analüüs UVP Biosepctrum 510<sup>TM</sup> Imaging Systems masinas. Tulemustest selgus, et TCDD-ga töödeldud Su86.86 (Joonis 6A, B) ja BxPc-3 (Joonis 6C, D) rakkudes langeb AHR-i valgu tase

vastavalt 34% ja 30% võrra. Samas 10  $\mu$ M Bay-ga töötlemisel rakkudes AHR-i valgu tase tõuseb Su86.86 rakkudes 1,5 korda ja BxPc-3 rakuliinis 2,1 korda. Lisaks tõusis AHR-i tase BxPc-3 rakuliinis 1  $\mu$ M Bay töötluselt 1,6 korda (Joonis 6C,D).



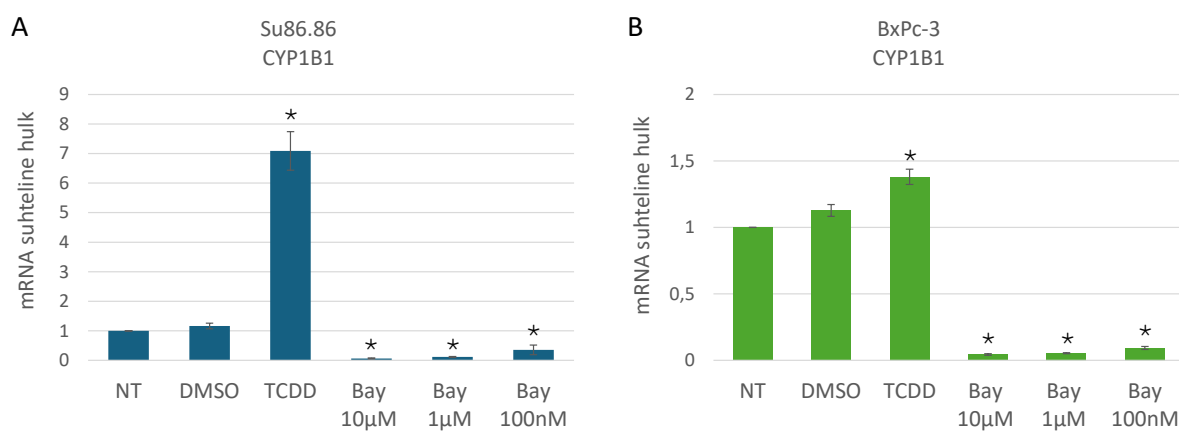
**Joonis 6. AHR-i valgu tasemed Su86.86 ja BxPc-3 rakuliinides.** A ja C: Valgu suhteline hulk Su86.86 ja PxPc-3 rakuliinis määrati densitomeetrilise analüüsiga kolme katsekorduse põhjal. B ja D: *Western blot* analüüs AHR-i ja aktiini vastaste antikehadega. Su86.86 ja BxPc-3 rakuliine inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) juuresolekul 24h. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (\*  $p < 0,05$  vs DMSO).

On teada, et mRNA ekspressiooni muutused ei pea kajastuma valgu tasemetes. On mitmeid mehhanisme, mis võivad mõjutada mRNA ja valkude erinevat dünaamikat. Näiteks võivad miRNA-d tugevalt reguleerida mRNA stabiilsust või translatsiooni (Bartel, 2009). Olemas on ka andmeid selle kohta, et miRNA-d, on võimelised ise reguleerima AHR-i mRNA-d (Liu *et al.*, 2018). Kas miRNA-d võiksid ka PDAC rakuliinides AHR-i ekspressiooni mõjutada, käesolevas töös kontrollida ei jõutud. On teada, et pärast aktiveerimist transporditakse AHR tuumast tsütoplasmasse, kus see proteasoomis lagundatakse (Larigot *et al.*, 2018). Seetõttu võib TCDD-ga täheldatud AHR-i taseme langus olla tingitud just selle liigsele aktivatsioonile järgnevast proteasomaalsest lagundamisest. AHR-i inhibiitor takistab AHR-i aktivatsiooni ning selle translokatsiooni tuuma. Seega võib inhibiitorist tingitud AHR-i valgu taseme tõus olla põhjustatud just selle akumulereerumist tsütoplasmasse, kuna ei toimu tuuma translokatsioonile järgnevat eksporti ning proteasomaalset lagundamist.

### 2.3.2. Arüülsüivesinike retseptori klassikaliste sihtmärkgeenide ekspressioon PDAC rakuliinides pärast töötlust AHR-i aktivaatori või inhibiitoriga

Kinnitamaks, et katsetes kasutatud kemikaalid aktiveerivad või inhibeerivad AHR-i kasutatakse tihti AHR-i sihtmärkgeenide ekspressiooni analüüsi. Ühed klassikalisemad märklaudgeenid selleks puhuks on CYP1A1 ja CYP1B1, millede puhul on teada AHR-i otsene seondumine promootoralale ja transkriptsiooni aktivatsioon (Kress *et al.*, 1998). RT-qPCR analüüsi tulemustest selgus, et Su86.86 rakuliinis tõusis TCDD-ga töödeldud rakkudes CYP1B1 ekspressioon võrreldes töötlemata rakkudega 7 korda ning BxPc-3 rakuliinis 1,38 korda.

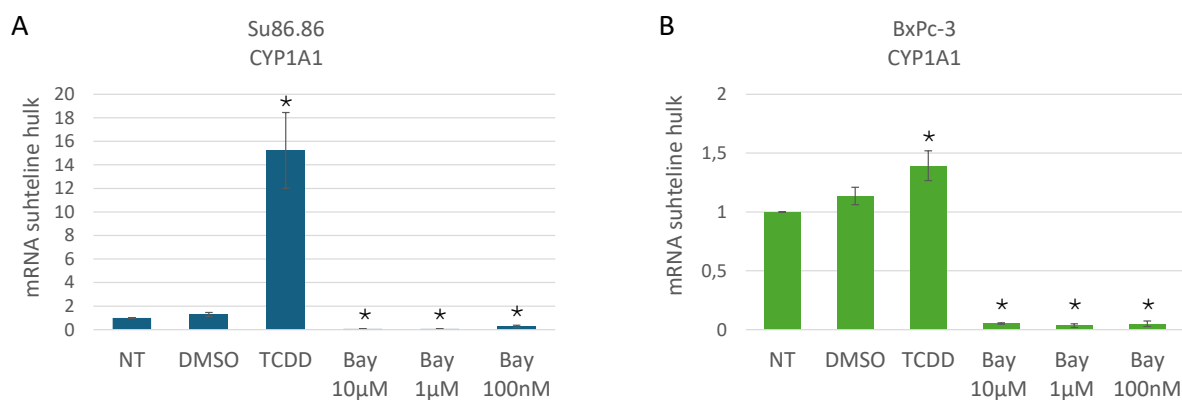
Esmalt uuriti AHR-i klassikalisi sihtmärkgeene *CYP1A1* ja *CYP1B1*, et määrata, kas antud rakuliinides mõjutavad agonistid ja antagonistid AHR-i inhibitsiooni ning aktivatsiooni. Su86.86 rakuliinis tõusis TCDD-ga töödeldud rakkudes *CYP1B1* ekspressioon võrreldes töötlemata rakkudega 7 korda ning ka BxPc-3 rakuliinis täheldati minimaalset tõusu 1,38 korda. Lisaks sellele vähendasid AHR-i antagonistid võrreldes kontrolliga *CYP1B1* ekspressiooni Su86.86 rakuliinis doosist sõltuvalt 94-65 % ning BxPc-3 rakuliinis 96-90 % (Joonis 7A,B).



**Joonis 7. AHR-i aktiivsuse moduleerimise mõju CYP1B1 ekspressioonile Su86.86 ja BxPc-3 rakuliinides.** Su86.86 (A) ja BxPc-3 (B) rakuliine inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10 µM, 1 µM ja 100 nM) juuresolekul 24h. *CYP1B1* ekspressioon määrati RT-qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel eraldi tehtud katsel (\* p < 0,05 vs DMSO).

*CYP1A1* puhul täheldati *CYP1B1*-ga sarnaseid tulemusi. Su86.86 rakkudes põhjustas TCDD 15-kordse ning BxPc-3 rakuliinis 1,4-kordse *CYP1A1* ekspressiooni suurenemise (Joonis 8A,B). Antagonisti mõjul vähenes Su86.86 rakkudes geeniekspressioon 93-73 % ning BxPc-3 rakkudes 97-95 %. Olgugi, et TCDD toime sihtmärkgeenide ekspressioonile on suuresti kooskõlas varasemalt leituga (Teino *et al.*, 2020), on mõneti üllatav selle väheldane toime

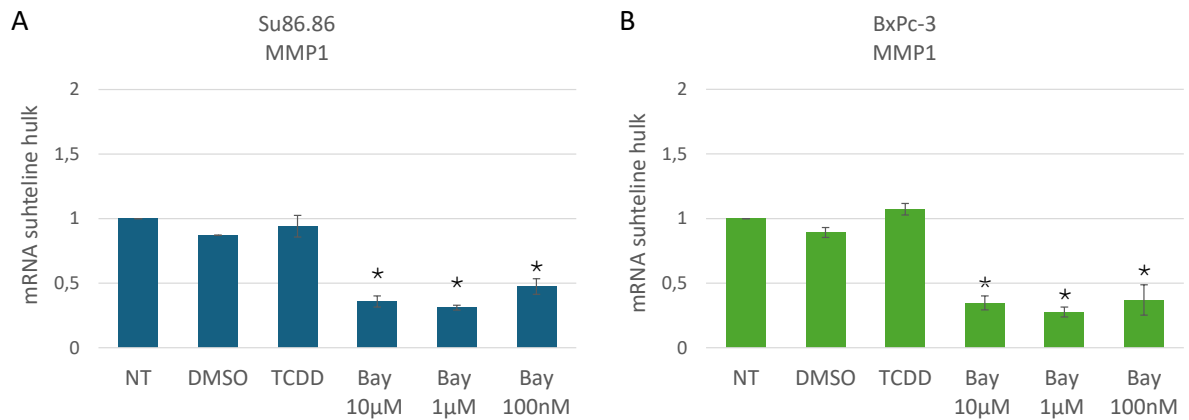
BxPc-3 rakuliinis. See võib olla tingitud asjaolust, et neis rakkudes on AHR juba endogeenselt aktiveeritud ning lisa aktivatsioonil TCDD poolt väga suurt efekti ei ole. Samuti toetab seda asjaolu, et AHR-i inhibiitor suudab suurelt vähendada *CYP1A1* ja *CYP1B1* ekspressiooni.



**Joonis 8. AHR-i aktiivsuse moduleerimis mõju *CYP1A1* ekspressioonile Su86.86 ja BxPc-3 rakuliinides.** Su86.86 (A) ja BxPc-3 (B) rakke inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10 µM, 1 µM ja 100 nM) juuresolekul 24h. Geenide ekspressioon määrati qPCR analüüsiga ja normaliseeriti TBP-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (\* p < 0,05 vs DMSO).

### 2.3.3. AHR-i agonisti ja antogonisti mõju *MMP1* ekspressioonile

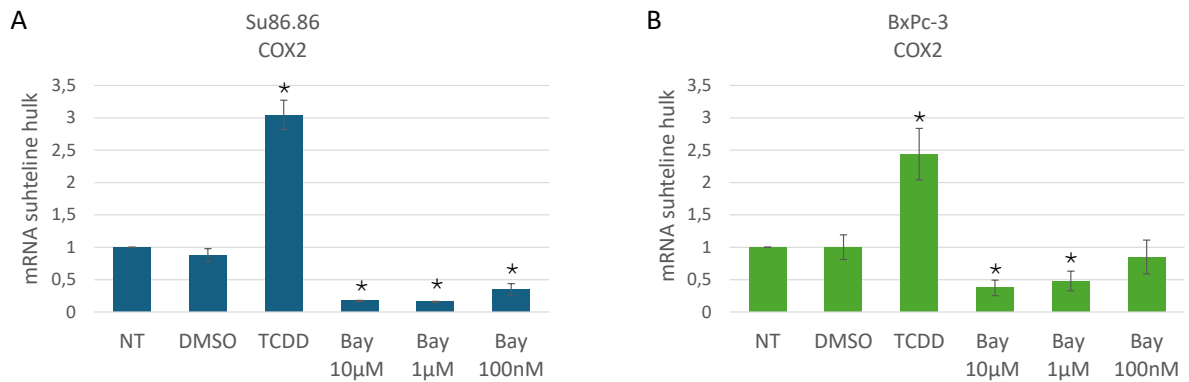
Kokkupuude keskkonna saastega, nagu TCDD, võib põhjustada mitmesuguseid patoloogilisi muutusi inimestel, aktiveerides sellega AHR-i rada. Varasemad uuringud on proovinud välja selgitada TCDD mõju maatriksi metalolproteinaasi 1 (*MMP1*) tasemele. Uuringute andmed näitavad, et TCDD-ga kokkupuude suurendab *MMP1* ekspressiooni ning see koostoime hõlmab nii transkriptsioonilisi kui ka post-transkriptsioonilisi mehhanisme. Oluline on see, et rakuvälise maatriksi ümberkujundamine on võtmeprotsess rakkude migratsioonis ja invasioonis (Murphy et al., 2004). Antud töös TCDD-ga töödeldud Su86.86 ja BxPc-3 rakkudes *MMP1* geeniekspressioon suurenemist ei täheldatud (Joonis 9A, B). Samas AHR-i antogonisti mõjul *MMP1* mRNA ekspressiooni tase langes. Su.86.86 rakuliini puhul täheldati *MMP1* mRNA taseme langust 69-53 % võrra ning BxPc-3 rakuliinis 72-63 % võrra (Joonis 9). Selgus, et TCDD ei suurendanud *MMP1* ekspressiooni ei suuremalt keratinotsüütide puhul on leitud (Murphy et al., 2004). See võib olla tingitud AHR-i endogeenselt aktivatsioonist, mistõttu lisaaktivatsioonil efekti ei ole. Samas on oluline rõhutada AHR-i inhibiitori toimet *MMP1* ekspressioonitaseme vähenemises. See toob välja AHR-i inhibeerimise potentsiaali kasvajakude migratsiooni ja invasiooni vähendamisel ning vajab kindlasti edasist uurimist.



**Joonis 9. MMP1 mRNA ekspressioon PDAC rakuliinides.** Su86.86 (A) ja BxPc-3 (B) rakuliine inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10 μM, 1 μM ja 100nM) juuresolekul 24h. *MMP1* ekspressiooni määrati RT-qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel eraldi tehtud katsel (\*  $p < 0,05$  vs DMSO).

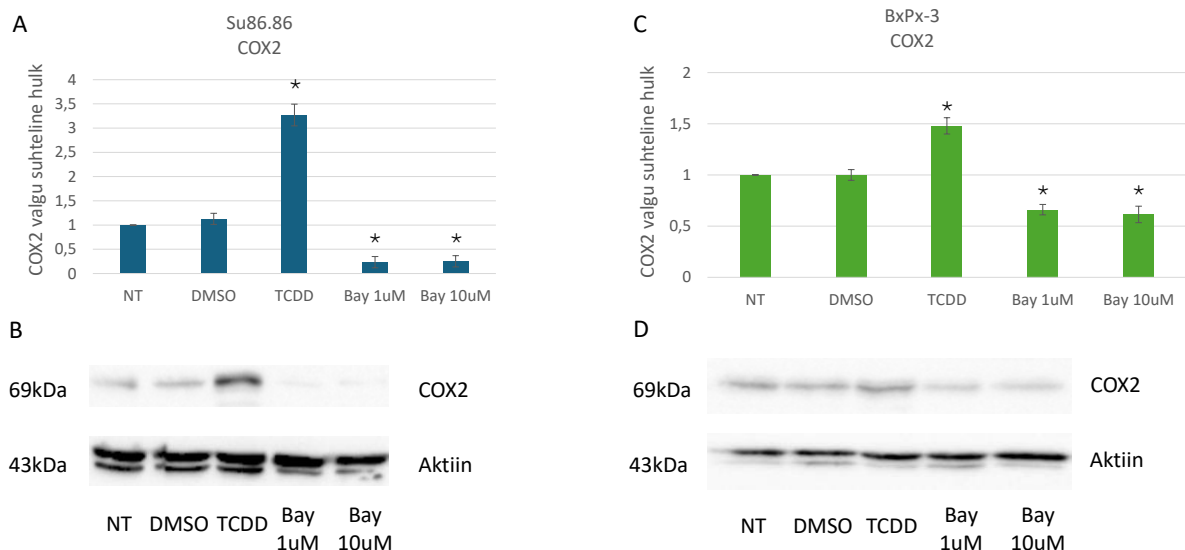
#### 2.3.4. AHR-i agonisti ja antagonistide mõju COX2 ekspressioonile

Varasemad uuringud on näidanud, et AHR-i aktiveerimine ligandide poolt võib erinevate rakutüüpide puhul indutseerida COX2 ekspressiooni (Weiss *et al.*, 1990). See viitab sellele, et AHR võib mõjutada COX2 vahendatud põletikulist reaktsiooni. Selgitamiseks, kas AHR-i aktiivsuse moduleerimine võiks reguleerida COX2 ekspressiooni ka PDAC rakuliinides, viidi läbi RT-qPCR analüüs. Tulemustest selgus, et TCDD-ga töödeldud Su86.86 rakuliinis tõusis ekspressioon 3 korda (Joonis 10A) ning BxPc-3 rakkudes 2,4 korda (Joonis 10B). Lisaks sellele täheldati, et erinevad Bay kontsentratsioonid vähendavad COX2 ekspressiooni. Antud juhul langes Su86.86 rakkudes geeniekspressioon 83-66 % võrra ja BxPc-3 rakkudes 63-52 % võrra. Tulemuste põhjal võib järeldada, et PDAC rakkudes võib AHR reguleerida COX2 ekspressiooni läbi otsese interaktsiooni selle promotoriga nagu on varem leitud (Denger *et al.*, 2009).



**Joonis 10. COX2 mRNA ekspressioon PDAC rakuliinides.** Su86.86 (A) ja BxPc-3 (B) rakuliine inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10 μM, 1 μM ja 100nM) juuresolekul 24h. COX2 ekspressiooni määrati RT-qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel eraldi tehtud katsel (\*  $p < 0,05$  vs DMSO).

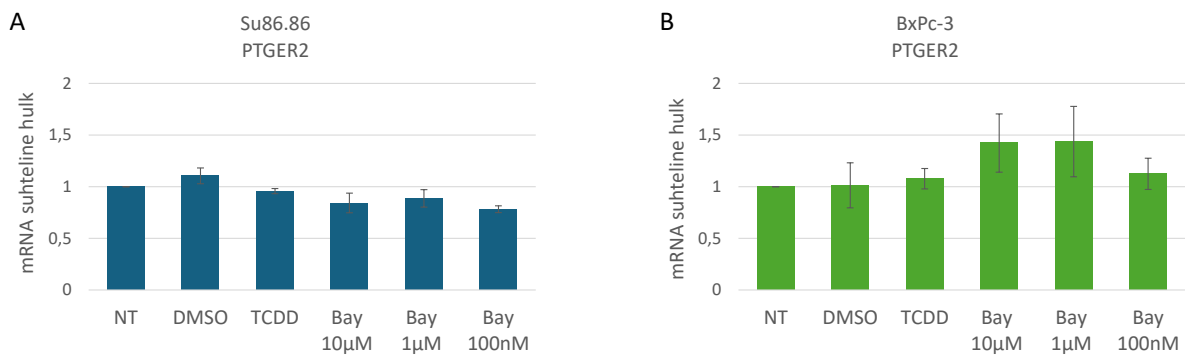
RT-qPCR-i tulemuste kinnitamiseks tehti järgnevalt SDS-PAGE ja *Western blot* analüüs, kasutades COX2 ja aktiini vastaseid antikehasid. Tulemuste kvantifitseerimiseks tehti densitomeetria analüüs UVP Biosepctrum 510<sup>TM</sup> Imaging Systems masinas. Sarnaselt qPCR-i tulemusele oli ka COX2 valgu tase tõusnud, kui rakke oli töödeldud TCDD-ga. Su86.86 rakkudes suurenes COX2 valgu tase 3,3 korda (Joonis 11A, B) ja BxPc-3 oma 1,5 korda (Joonis 11C, D). Sarnaselt RT-qPCR-ile vähenes COX2 valgu tase erinevate Bay kontsentratsioonide juures. Su86.86 rakuliinis vähenes COX2 tase 75-77 % võrra ning BxPc-3 rakuliinis 34-39 % võrra. Need tulemused näitavad, et nii AHR-i aktivaator TCDD kui ka inhibiitor Bay mõjutavad COX2 ekspressiooni nii mRNA kui ka valgu tasemel. Lisaks viitavad käesolevas töös saadud tulemused, et COX2 võib nendes kahes PDAC rakuliinis olla potentsiaalselt AHR-i otsene märklaud nagu täheldatud varasemas teaduspublikatsioonis (Denger *et al.*, 2009).



**Joonis 11. COX2 valgu tase PDAC rakuliinides.** Su86.86 ja BxPc-3 rakuliinis valgu suhteline hulk määrati densitomeetrilise analüüsiga kolme korduse põhjal (A, C) ning *Western blot* analüüs COX2 ja aktiini vastaste antikehadega (B, D). Su86.86 ja BxPc-3 rakuliine inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) juuresolekul 24h. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (\*  $p < 0,05$  vs DMSO).

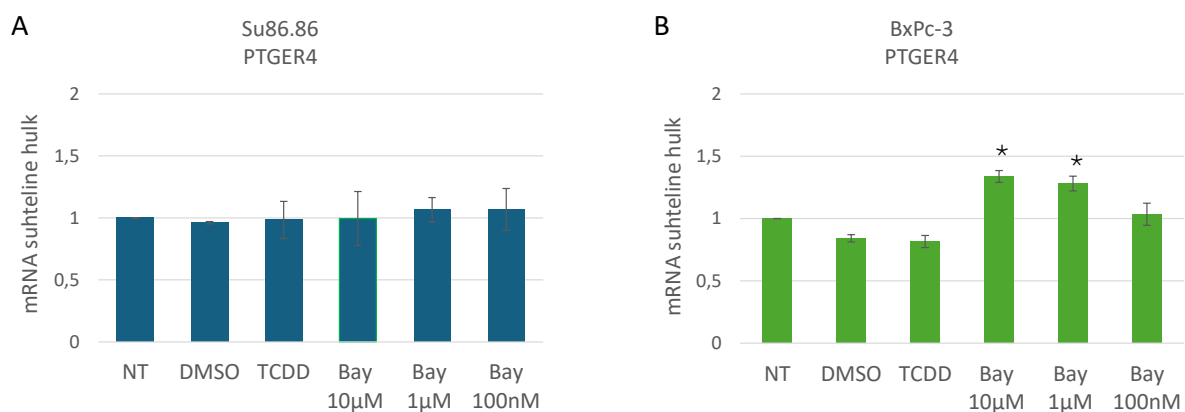
### 2.3.5. AHR-i agonisti ja antagonistide mõju PGE2 retseptorite ekspressioonile

Eelnevalt tegime kindlaks, et AHR aktiivsuse moduleerimine mõjutab COX2 taset, mis on PGE2 sünteesi limiteeriv ensüüm. Samuti on meie laboris varem leitud, et Bay vähendab söötmesse sekreteeritud PGE2 taset nii Su.86.86 kui ka BxPc-3 rakuliinis, kuid TCDD puhul märgatavaid erinevusi märgata ei olnud (avaldamata andmed). Selgitamaks, kas AHR-i aktiivsuse moduleerimine võiks ka PGE2 retseptorite taset mõjutada, teostati RT-qPCR, määramaks *PTGER1-4* ekspressiooni muutusi TCDD ja Bay töötamise järel. Tulemustest selgus, et *PTGER1* ning *PTGER3* ei olnud PDAC rakuliinides ekspresseeritud. *PTGER2* tase see-eest oli detekteeritav kuid statistiliselt olulisi muutusi selle ekspressioonis ei täheldatud ei Su.86.86 ega ka BxPc-3 rakuliini puhul (Joonis 12A, B).



**Joonis 12. AHR-i aktiivsuse moduleerimis mõju PTGER2 ekspressioonile Su86.86 ja BxPc-3 rakuliinides.** Su86.86 (A) ja BxPc-3 (B) rakuliine inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10 µM, 1 µM ja 100nM) juuresolekul 24h. *PTGER2* ekspressiooni määrati RT-qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel eraldi tehtud katsel.

*PTGER4* ekspressioonis ei täheldatud olulisi muutusi Su.86.86 rakuliini puhul (Joonis 13A). Seevastu BxPc-3 rakkudes suurendas AHR-i inhibeerimine 10 µM ja 1 µM Bay juuresolekul *PTGER4* mRNA ekspressiooni vastavalt 1,33 ja 1,28 korda (Joonis 13B). *PTGER4* vahendab PGE2 toimet ja omakorda aktiveerib COX2 ekspressiooni kasvajakudedes (Majumder *et al.*, 2015). Arvestades, et Bay puhul oli *PTGER4* ekspressiooni indutseeriv toime marginaalne, võiks arvata, et see ei ole tingitud mitte otsesest AHR-i interaktsioonist *PTGER4* promootoriga, vaid pigem tagasisidemehhanismist, mis on tingitud PGE2 hulga vähenemist söötmes, mida rakk püüab kompenseerida *PTGER4* hulga suurendamisega raku pinnal.



**Joonis 13. AHR-i aktiivsuse moduleerimis mõju PTGER4 ekspressioonile Su86.86 ja BxPc-3 rakuliinides.** Su86.86 (A) ja BxPc-3 (B) rakuliine inkubeeriti DMSO, TCDD (10nM), Bay (10 µM, 1 µM ja 100nM) juuresolekul 24h. *PTGER4* ekspressiooni määrati RT-qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (NT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel eraldi tehtud katsel (\*  $p < 0,05$  vs DMSO).

## KOKKUVÖTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida AHR-i agonisti ja antagonistide mõju selle enese geeniekspressioonile ja valgu moduleerimise mõju selle klassikalistele sihtmärkgeenidele ning geenidele, mis on varasemalt seotud kasvaja metastaseerumise ja invasiivsusega, kuid ka immuunregulatiivsete markerite ekspressioonile pankrease vähirakuliinides.

Antud töö eksperimentaalse osa tulemusena selgus, et AHR on ekspresseeritud ja endogeenselt aktiivne nii rakuliinis Su86.86 kui ka BxPc-3. Kummaski rakuliinis TCDD ega Bay AHR-i mRNA ekspressioonile olulist mõju ei avaldanud, kuid AHR-i valgu taseme langus oli märgata TCDD puhul mõlemas rakuliinis. BxPc-3 rakuliinis suurendas Bay töötlus AHR-i valgu hulka. Samuti kontrolliti ka AHR-i sihtmärkgeenide *CYP1A1* ja *CYP1B1* ekspressiooni rakuliinides, kus täheldati TCDD-poolset ekspressiooni induktsiooni ning Bay-poolset repressiooni. Kasvajarakkude invasiivsuse ja migratsiooniga seostatud *MMP1* ekspressioonis täheldati vähenemist AHR-i inhibitsiooni korral. Seevastu nii COX2 mRNA kui ka valgu tase oli positiivses korrelatsioonis AHR-i aktiivsusega, mis viitab selle geeni otsesele regulatsioonile AHR-i poolt. Antud tulemust toetab ka meie laboris varasemalt leitud, et AHR-i inhibitsioonist tingitud COX2 ekspressiooni langusest tingituna väheneb PGE2 tase rakukultuuri söötmes. Viimaseks selgitati AHR-i aktiivsuse moduleerimise toimet PGE2 retseptorite PTGER1-4 ekspressioonile. Selgus, et PTGER1 ning 3 ei ole kasutatud rakuliinides avaldunud. Seevastu PTGER2 ja 4 ekspressioon oli detekteeritav, kusjuures Bay suurendab oluliselt PTGER4 mRNA hulka BxPc-3 rakuliinis.

Kokkuvõttes laiendab käesolev bakalaureusetöö meie arusaama AHR-i rollist ning selle potentsiaalsetest märklaugeenidest pankreasejuha adenokartsinoomi rakuliinides. Samuti loob see alustadmisi edasisteks uuringuteks, selgitamaks, kas ning kuidas võiks AHR-i aktiivsuse vähendamine mõjutada pankreasevähi invasiivsust ja migratsiooni või suhtlust immuunrakkudega.

# **„ Effects of aryl hydrocarbon receptor agonist and antagonist on gene expression and protein levels in pancreatic cancer cell lines“**

Kirill Matiitšin

## **SUMMARY**

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common type of pancreatic cancer. PDAC is asymptomatic in early stages and resistant to treatment, contributing to high mortality rate. Due to PDAC's resistance to typical cancer treatments such as chemotherapy and radiation therapy, there is increasing search for new therapeutic options. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor, which is often upregulated in cancer cells. PDAC cells have been found to show higher levels of *AHR* expression compared to non-cancerous pancreatic cells. AHR mediates the effects of various environmental chemicals, such as polycyclic and halogenated hydrocarbons. In cancers, high expression of *AHR* is correlated with increased cell proliferation, invasion, migration and metastasis. However, AHR activation by some ligands can lead to cancer cell growth inhibition and even apoptosis. Cyclooxygenase 2 (COX2) is protein which is involved in the bypassing of apoptosis in tumour cells. COX2 is part of the COX2/PGE2/PTGER2 pathway, which is associated with promoting cell proliferation, invasion and angiogenesis. Modulation of this pathway has been investigated as a potential therapeutic strategy in cancer treatment.

The aim of the study was to investigate the effects of AHR agonist and antagonist on the gene and protein expression of AHR in Su86.86 and BxPc-3 pancreatic cell lines. Although no effect was observed on mRNA expression, TCDD decreased and Bay increased AHR protein levels in both cell lines. Secondly, the expression of classical AHR target genes CYP1A1 and CYP1B1 was examined. Expectedly TCDD increased and Bay decreased their expression. Additionally, genes associated with apoptosis were tested. MMP1 expression was decreased by Bay in both cell lines. Moreover, COX2 correlated positively with AHR activity indicating it to be a direct AHR target gene. The receptors for PGE2, the product of the COX2 enzyme, PTGER1-4 were also investigated in Su.86.86 and BxPc-3 cell lines. We determined that PTGER1 and 3 are not expressed in these cells, whereas PTGER2 and 4 were detectable. Moreover, PTGER4 expression was elevated when BxPc-3 cells were treated with the AHR inhibitor Bay.

In conclusion, the current thesis expands our knowledge on the role of AHR and its target genes in pancreatic ductal adenocarcinoma. It also lays a foundation for further experiments

to clarify how AHR activity inhibition could influence PDAC invasiveness and migration or communication with immune cells.

## KIRJANDUSE LOETELU

Adamska, A., Domenichini, A. and Falasca, M. (2017). Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1338.

Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC cancer.* 9, 187.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* 136(2), 215-233

Bekki, K., Vogel, H., Li, W., Ito, T., Sweeney, C., Haarmann-Stemmann, T., Matsumura, F. and Vogel, C.F. (2015). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates resistance to apoptosis induced in breast cancer cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120, 5–13.

Cavallo, D., Ursini, C. L., Cascio, C., & Iavicoli, S. (2019). The role of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage-induced carcinogenicity: a review of the molecular mechanisms. *Mutat. Res-Rev. Mutat.* 779, 38-55.

Degner, S. C., Papoutsis, A. J., Selmin, O., & Romagnolo, D. F. (2009). Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells. *The Journal of nutrition.* 139(1), 26–32.

Denison, M.S. and Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334

DiNatale, B.C., Schroeder, J.C. and Perdew, G.H. (2011). Ah receptor antagonism inhibits constitutive and cytokine inducible IL6 production in head and neck tumor cell lines. *Mol. Carcinog.* 50, 173–183.

Eibl, G., Bruemmer, D., Okada, Y., Duffy, J.P., Law, R.E., Reber, H.A. and Hines, O.J. (2003). PGE<sub>2</sub> is generated by specific COX-2 activity and increases VEGF production in COX-2-expressing human pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 887–897.

Ershov, P. V., Yablokov, E. O., Kaluzhskiy, L. A., Mezentsev, Y. V., & Ivanov, A. S. (2022). Prostanoid Signaling in Cancers: Expression and Regulation Patterns of Enzymes and Receptors. *Biology.* 11(4), 590.

Fader KA, Nault R, Ammendola A, et al. The aryl hydrocarbon receptor modulates the function of human CD56<sup>dim</sup> NK cells. *Eur J Immunol.* 2014;44(10):3068-3078.

Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J. (1996). Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 173–179.

Furness, S.G., Lees, M.J. and Whitelaw, M.L. (2007). The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors. *FEBS Lett.* 581, 3616– 3625.

Guan, R., Wang, J. W., Li, Y. F., Cai, H., Li, X. Y., & Wan, J. Y. (2021). Aryl hydrocarbon receptor degradation induces lung cancer cell arrest at the G1 phase and decreases cyclin D1 expression. *OncoTargets. Ther.* 14, 2715-2725

Hubbard, T.D., Murray, I.A. and Perdew, G.H. (2015). Indole and tryptophan metabolism: endogenous and dietary routes to Ah receptor activation. *Drug Metab. Dispos.* 43, 1522–1535.

Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y. and Kawajiri, K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 2895–2904.

Jin, U.-H., Kim, S.-B. and Safe, S. (2015). Omeprazole inhibits pancreatic cancer cell invasion through a nongenomic aryl hydrocarbon receptor pathway. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 907–918

Kingisepp, P.-H. (2019). Kõhunäärme Langerhansi saared, p. 230. In Kingisepp, P.-H., Inimese füsioloogia, 7th ed., Atlex, Tartu.

Koliopanos, A., Kleeff, J., Xiao, Y., Safe, S., Zimmermann, A., Büchler, M.W. and Friess, H. (2002). Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer. *Oncogene* 21, 6059–607

Konsa, P. (2021). Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju inimese pankreasejuha adenokartsinoomi rakkude geeniekspressioonile.

Kress, S., Reichert, J., & Schwarz, M. (1998). Functional analysis of the human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) gene enhancer. *Eur. J. Biochem.* 258(2), 803–812.

Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J. and Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open* 7, 1–9.

Larsen, J., Alexander, J., Autrup, H., Barlow, S., Cerebelli, R. and Schlatter, J. (2002). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons—Occurrence in foods, dietary exposure and health effects. Brussels: European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scf\\_out154\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out154_en.pdf)

Liu, C. C., Xia, M., Zhang, Y. J., Jin, P., Zhao, L., Zhang, J., Li, T., Zhou, X. M., Tu, Y. Y., Kong, F., Sun, C., Shi, L., & Zhao, M. Q. (2018). Micro124-mediated AHR expression regulates the inflammatory response of chronic rhinosinusitis (CRS) with nasal polyps. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 500(2), 145–151.

Liu, H., Kato, Y., Erzinger, S. A., Kiriakova, G. M., Qian, Y., Palmieri, D., Steeg, P. S., & Price, J. E. (2012). The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. *BMC cancer*, 12, 583.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta CT$  method. *Methods* 25, 402–408.

Majumder, M., Landman, E., Liu, L., Hess, D., & Lala, P. K. (2015). COX-2 Elevates Oncogenic miR-526b in Breast Cancer by EP4 Activation. *Mol. Cancer. RES. MCR*, 13(6), 1022–1033.

Mandal, P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. B* 175, 221–230.

Monostory, K., Pascussi, J.-M., Kóbori, L. and Dvorak, Z. (2009). Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metab. Rev.* 41, 547–572.

Moorthy, B., Chu, C. and Carlin, D.J. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol. Sci.* 145, 5–15.

Moreno-Marín, N., Merino, J. M., Alvarez-Barrientos, A., Patel, D. P., Takahashi, S., González-Sancho, J. M., Gandolfo, P., Rios, R. M., Muñoz, A., Gonzalez, F. J., & Fernández-Salguero, P. M. (2018). Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Liver Polyploidization and Inhibits PI3K, ERK, and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *iScience*, 4, 44–63.

Mulero-Navarro, S. and Fernandez-Salguero, P.M. (2016). New trends in aryl hydrocarbon receptor biology. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 45.

Murphy, K. A., Villano, C. M., Dorn, R., & White, L. A. (2004). Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoic acid pathways increases matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes. *The Journal of biological chemistry*, 279(24), 25284–25293.

Nault, R., Forgacs, A.L., Dere, E. and Zacharewski, T.R. (2013). Comparisons of differential gene expression elicited by TCDD, PCB126,  $\beta$ NF, or ICZ in mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells and C57BL/6 mouse liver. *Toxicol. Lett.* 223, 52–59.

Nebert, D.W. (2017). Aryl hydrocarbon receptor (AHR):“pioneer member” of the basic helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of “sensors” of foreign and endogenous signals. *Prog. Lipid Res.* 67, 38–57.

Nguyen, C. H., Senfter, D., Basilio, J., Holzner, S., Stadler, S., Krieger, S., Huttary, N., Milovanovic, D., Viola, K., Simonitsch-Klupp, I., Jäger, W., de Martin, R., & Krupitza, G. (2015). NF- $\kappa$ B contributes to MMP1 expression in breast cancer spheroids causing paracrine PAR1 activation and disintegrations in the lymph endothelial barrier in vitro. *Oncotarget*, 6(36), 39262–39275.

Nguyen, N.T., Nakahama, T., Nguyen, C.H., Tran, T.T., Le, V.S., Chu, H.H. and Kishimoto, T. (2015). Aryl hydrocarbon receptor antagonism and its role in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Pharmacol.* 7, 29.

Novikov, O., Wang, Z., Stanford, E.A., ... Sherr, D.H. (2016). An aryl hydrocarbon receptor-mediated amplification loop that enforces cell migration in ER-/PR-/Her2- human breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 90, 674–688.

Ogura, J., Miyauchi, S., Shimono, K., Yang, S., Gonchigar, S., Ganapathy, V. and Bhutia, Y.D. (2017). Carbidopa is an activator of aryl hydrocarbon receptor with potential for cancer therapy. *Biochem. J.* 474, 3391–3402.

Park, H., Jin, U., Karki, K., Jayaraman, A., Allred, C., Michelhaugh, S.K., Mittal, S., Chapkin, R.S. and Safe, S. (2020). Dopamine is an aryl hydrocarbon receptor agonist. *Biochem. J.* 477, 3899–3910.

Poland, A., Glover, E. and Kende, A. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 251, 4936–4946

Ryan, D.P., Hong, T.S. and Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 371, 1039–1049.

Safe, S., Lee, S.-O. and Jin, U.-H. (2013). Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. *Toxicol. Sci.* 135, 1–16.

Sakurai, S. (2017). The crystal structure of the AhRR–ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 292, 17609– 17616.

Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 257–276.

Shimada, T. and Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 95, 1–6.

Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* 70, 7–30.

Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* 70, 7–30.

Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L. and Diederich, M. (2010). The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int. J. Cell Biol.* 2010.

Stockinger, B., Meglio, P.D., Gialitakis, M. and Duarte, J.H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 403–432.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA-Cancer J. Clin.* 71, 209–249.

Sweeney, C., Lazennec, G., & Vogel, C. F. A. (2022). Environmental exposure and the role of AhR in the tumor microenvironment of breast cancer. *Front. Pharmacol.* 13, 1095289.

Zhang, X., Yan, K., Deng, L., Liang, J., Liang, H., Feng, D., & Ling, B. (2019). Cyclooxygenase 2 Promotes Proliferation and Invasion in Ovarian Cancer Cells via the PGE2/NF-κB Pathway. *Cell. Transplant.* 28(1\_suppl), 1S–13S.

Teino, I., Matvere, A., Pook, M., ... Maimets, T. (2020). Impact of AHR Ligand TCDD on Human Embryonic Stem Cells and Early Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9052.

- Tsai, M. J., Hsu, Y. L., Wang, T. N., Wu, L. Y., Lien, C. T., Hung, C. H., Kuo, P. L., & Huang, M. S. (2014). Aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists increase airway epithelial matrix metalloproteinase activity. *J. Mol. Med.* 92(6), 615–628.
- Vareedayah, A.A., Alkaade, S. and Taylor, J.R. (2018). Pancreatic adenocarcinoma. *Mo. Med.* 115, 230.
- Weiss, R. B., Donehower, R. C., Wiernik, P. H., Ohnuma, T., Gralla, R. J., Trump, D. L., ... & Von Hoff, D. D. (1990). Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol*, 8(7), 1263-1268.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* 26, 19.
- Vogel, C. F. A., Van Winkle, L. S., Esser, C., & Haarmann-Stemmann, T. (2020). The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors - Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. *Redox. biol.* 34, 101530
- Wolff, S., Harper, P.A., Wong, J.M., Mostert, V., Wang, Y. and Abel, J. (2001). Cell-specific regulation of human aryl hydrocarbon receptor expression by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Mol. Pharmacol.* 59, 716–724.
- Yu, S., Tu, R., Chen, Z., Song, J., Li, P., Hu, F., Yuan, G., Zhang, R., & Li, Y. (2023). Association of PTGER4 and PRKAA1 genetic polymorphisms with gastric cancer. *BMC Med. Genomics.* 16(1), 209.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. Ensembl-  
[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000106546;r=7:16916359-17346152](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000106546;r=7:16916359-17346152) (kasutatud 04.11.2023)
2. NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/196> (kasutatud 04.11.2023)
3. Uniprot - <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35869/entry> (kasutatud 04.11.2023)
4. Human Protein Atlas – <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106546-AHR/tissue> (kasutatud 04.05.2024)
5. Eesti Vähiliit – <https://cancer.ee/statistika-2/> (kasutatud 05.05.2024)
6. Biorender - <https://www.biorender.com/> (kasutatud 04.05.2024)

## LISAD

### Lisa 1. qPCR-is kasutatud oligonukleotiidid

Praimer (F – <i>forward</i> / R – <i>reverse</i> )	Nukleotiidne järjestus
AHR_mRNA_F	5'-ATTACAGGCTCTGAATGGCTTTG-3'
AHR_mRNA_R	5'-TGACATCAGACTGCTGAAACCCTAG-3'
COX2_mRNA_F	5'-AGGGTTGCTGGTGGTAGGAA-3'
COX2_mRNA_R	5'-GGTCAATGGAAGCCTGTGATACT-3'
CYP1A1_mRNA_F	5'-GCTGACTTCATCCCTATTCTTCG-3'
CYP1A1_mRNA_R	5'-TTTTGTAGTGCTCCTTGACCATCT-3'
CYP1B1_mRNA_F	5'-ACGTACCGGCCACTATCACT-3'
CYP1B1_mRNA_R	5'-CTCGAGTCTGCACATCAGGA-3'
MMP1_mRNA_F	5'-GGGGAGATCATCGGGACAACCTC-3'
MMP1_mRNA_R	5'-AGAATGGCGGAGTTCATGAGCT-3'
PTGER2_mRNA_F	5'-GCTCCTTGCCTTTCAGCATTT-3'
PTGER2_mRNA_R	5'-AGGATGGCAAAGACCCAAGG-3'
PTGER4_mRNA_F	5'-GGTCATCTTACTCATTGCCAC-3'
PTGER4_mRNA_R	5'-ACGAATACTCGCACCACGAG-3'
TBP_mRNA_F	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'
TBP_mRNA_R	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'

## LIHTLITSENTS

### Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kirill Matiitšin,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Arüülsüsivesinike retseptori agonisti ja antagonistide mõju pankrease vähirakuliinide geeniekspressioonile ja valgu tasemetele“,

mille juhendajad on Lilian Kadaja-Saarepuu ja Indrek Teino,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kirill Matiitšin

27.05.2024