

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Arüüsüsivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju inimese pankrease kasvaja
rakkude migratsioonile**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Egert Vene

Juhendaja

PhD Kristina Mäemets-Allas

TARTU 2024

„Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju inimese pankrease kasvaja rakkude migratsioonile”

Kõige sagedamini esinev kõhunäärmevähk on pankreasejuha adenokartsinoom (PDAC). PDAC-i ravivõimalused on limiteeritud ja prognoos halb – PDAC-i viie aasta elulemus on alla 10%. Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on transkriptsioonifaktor, mis erinevate geenide ekspressiooni reguleerimise kaudu mõjutab rakkude elutsüklis mitmeid protsesse. Varasemad uuringud on kirjeldanud AHR-i rolli kasvajaliste protsesside regulatsioonis. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida AHR-i antagonistide ja agonistide mõju PDAC rakkude migratsioonile normaal- ja hüpoksia tingimustes. Eksperimentide tulemusena vähenes hüpoksia tingimustes PDAC rakuliinide BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioon. Ühtlasi näitasid katsed, et AHR-i antagonist ja agonist mõjutavad erinevalt rakkude migratsiooni hüpoksia tingimustes.

Märksõnad: arüülsüivesinike retseptor, pankreasejuha adenokartsinoom, migratsioon

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

„Effects of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonist on cell migration in human pancreatic cancer cells”

The most common type of pancreatic cancer is pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The treatment options for PDAC are limited and the prognosis is poor - the five-year survival rate of PDAC is less than 10%. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a transcription factor that affects several processes in the cell life cycle by regulating the expression of various genes. Previous studies have described the role of AHR in the regulation of tumour processes. The aim of this bachelor thesis was to investigate the effects of AHR antagonist and agonists on the migration of PDAC cells under normal and hypoxic conditions. As a result of the experiments, the migration of PDAC cell lines BxPc-3 and SU.86.86 decreased under hypoxic conditions. Additionally, the experiments revealed that an AHR antagonist and agonist affected the cells' migration differently under hypoxic conditions.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor, human pancreatic ductal adenocarcinoma, migration

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

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	6
1.1. Pankreas.....	7
1.1.1. Pankrease anatoomia.....	7
1.1.2. Inimese pankrease kasvajakad	8
1.2. Arüülsüsivesinike retseptor	9
1.2.1. Arüülsüsivesinike retseptori struktuur.....	9
1.2.2. Arüülsüsivesinike retseptori aktivatsioon	10
1.2.3. Arüülsüsivesinike retseptori funktsioonid	11
1.2.4. Arüülsüsivesinike retseptori roll kasvajates.....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA	15
2.1. Töö eesmärgid.....	15
2.2. Materjal ja meetodika.....	15
2.2.1. Inimese pankreasevähi rakuliinide kasvatamine	15
2.2.2. Rakkude migratsioonivõime hindamine	15
2.2.3. <i>In vitro</i> kraape-meetodil haava paranemise katse	16
2.2.4. Andmeanalüüs.....	17
2.3. TULEMUSED	18
2.3.1. AHR-i antagonisti ja agonistide mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonivõimele.....	18
2.3.2. AHR-i antagonisti ja agonisti mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile normaal- ja hüpoksia tingimustes.....	20
2.4. ARUTELU	24
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY.....	28
KASUTATUD KIRJANDUS.....	29
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	35

KASUTATUD LÜHENDID

AHR	arüülsüivesinike retseptor (ingl <i>aryl hydrocarbon receptor</i>)
AIP	arüülsüivesinike retseptoriga seonduv valk (ingl <i>aryl hydrocarbon receptor interacting protein</i>)
ARNT	arüülsüivesinike retseptori tuuma translokaator (ingl <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>)
BAX	B-raku lümfoom-2-seoseline X-valk (ingl <i>B-cell lymphoma-2-associated X protein</i>)
BCL-2	B-raku lümfoom 2 (ingl <i>B-cell lymphoma 2</i>)
bHLH	aluseline heeliks-ling-heeliks motiiv (ingl <i>basic helix-loop-helix</i>)
BMP	luu morfogeneetiline valk (ingl <i>bone morphogenetic protein</i>)
CDKN2A	ingl <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
COX2	tsüklooksügenaas 2 (ingl <i>cyclooxygenase 2</i>)
CYP	tsütokroom P450 valk (ingl <i>cytochrome P450 protein</i>)
DMSO	dimetüülsulfoksiid (ingl <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
GNAS	ingl <i>GNAS complex locus</i>
HIF-1 α	hüpoksiat indutseeriv faktor-1 α (ingl <i>hypoxia inducible factor-1α</i>)
IDO	indoolamiin 2,3-dioksügenaas (ingl <i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>)
JAB1	Jun-aktivatsiooni domeeni siduv valk (ingl <i>Jun-activation domain binding protein</i>)
JNK	c-Jun N-terminaalse kinaasi (ingl <i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
KRAS	ingl <i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue</i>
KYN	L-künureniin (ingl <i>L-kynurenine</i>)
MAPK	mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas (ingl <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
PAH	polütsükliiline aromaadne süsivesinik (ingl <i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i>)

PAS	Per-ARNT-Sim (ingl <i>Period/ARNT/Single-Minded</i>)
PDAC	pankreasejuha adenokartsinoom (ingl <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>)
PG	prostaglandiin (ingl <i>prostaglandin</i>)
SMAD4	ingl <i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SNAI2	ingl <i>snail family transcriptional repressor 2</i>
TAD	transaktivatsiooni domeen (ingl <i>transactivation domain</i>)
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenso-p-dioksiin (ingl <i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i>)
TDO	trüptofaani dioksügenaas (ingl <i>tryptophan dioxygenase</i>)
XAP2	B-hepatiidi viiruse X-seoseline valk 2 (ingl <i>Hepatitis B virus X-associated protein 2</i>)
XIAP	X-seotud apoptoosivalgu inhibiitor (ingl <i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>)
XRE	ksenobiootikumi vastuselement (ingl <i>xenobiotic response element</i>)

SISSEJUHATUS

Kõhunäärmevähi kõige sagedamini esinev vorm on pankreasejuha adenokartsinoom (PDAC). Varase diagnoosi puudumise ja piiratud ravivõimaluste tõttu on PDAC halva prognoosiga pahaloomuline kasvaja (Stoffel jt., 2023). PDAC on seitsmes peamine vähktõvega seotud surma põhjus maailmas, mistõttu on vaja uurida PDAC-i toimimise mehhanisme uute potentsiaalsete terapeutiliste sihtmärkide leidmiseks (Bray jt., 2018).

Varasemate uuringute kohaselt võiks üheks potentsiaalseks PDAC-i sihtmärgiks olla ligand-aktiveeritav transkriptsioonifaktor AHR ehk arüüsüsivesinike retseptor. AHR-i liganditeks on erinevad keskkonnakemikaalid või endogeensed ühendid (Murray jt., 2014).

Aktiveeritud AHR mõjutab erinevate geenide ekspressiooni reguleerimise kaudu rakkude normaalseks talitluseks vajalikke geene, mis on seotud apoptoosi, immuunvastuse või migratsiooniga (Stevens jt., 2009). Varasemad uuringud on näidanud, et AHR-i ekspressiooni suurenemise või vähenemisega tekkivad muutused on erinevat päritolu kasvajatel seotud mitmete kasvajaliste protsessidega (Griffith ja Frankel, 2024). AHR-i laiaulatusliku mõju tõttu rakkude talitlusele on AHR mitmete terapeutiliste ravimite sihtmärgiks.

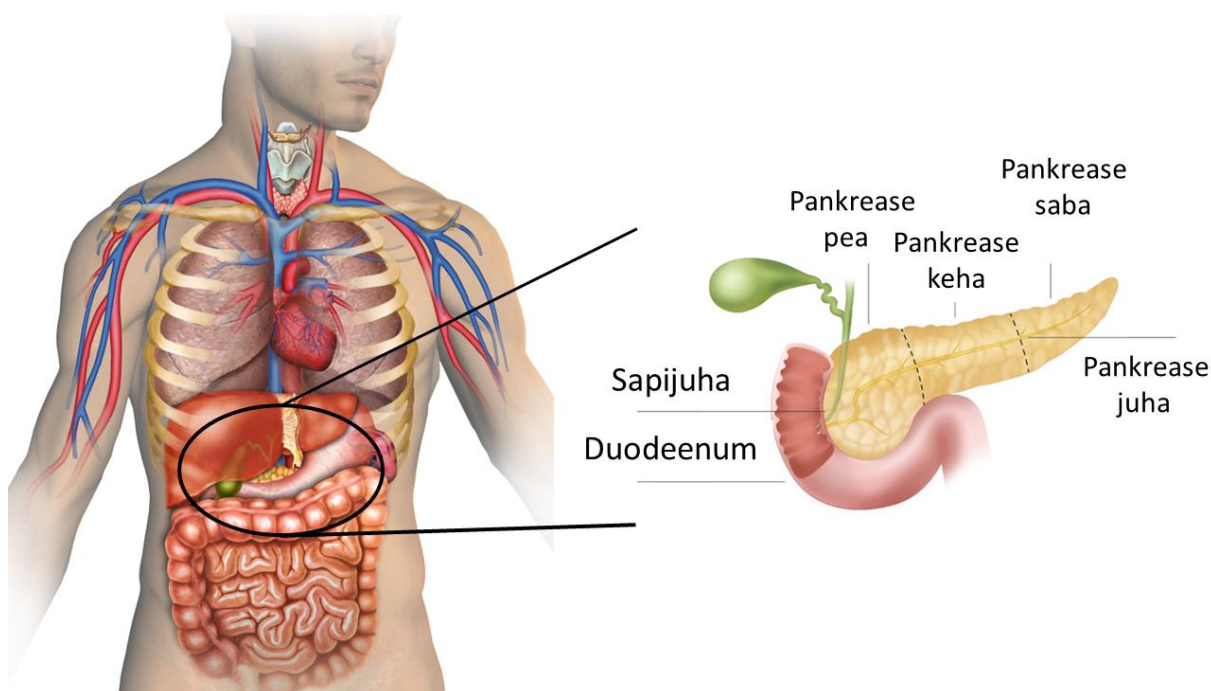
Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida AHR-i agonistide (TCDD ja KYN) ja antagonistide (BAY) mõju PDAC päritolu rakuliinide BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile. Lisaks sellele, hinnates rakkude migratsiooni, võrrelda, kas laboritingimustes tekitatud hüpoksia keskkond (suurem CO₂ kontsentratsioon kasvukeskkonnas) muudab PDAC-i rakud vastuvõtlikumaks AHR-i agonisti (TCDD) ja antagonistide (BAY) toimete suhtes. Saadud tulemused võimaldavad paremini mõista, kuidas kasvukeskkond võib mõjutada kasvajakude migratsiooni.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Pankreas

1.1.1. Pankrease anatoomia

Kõhunääre ehk pankreas on inimese seedetrakti üks suurimaid näärmeid. See saarikujulise ehitusega elund on keskmise massiga 70-80 g ning on tervel inimesel kreemikas-roosa värvusega. Tinglikult võib pankrease jagada kolmeks osaks - peaks, kehaks ja sabaks. Pankrease paksema osa (pea) ümber on duodeenum ja õhem osa (saba) ulatub kõhu tagaosas põrnani (Joonis 1) (Standing jt., 2016).



Joonis 1. Pankrease asukoht ja anatoomia. Joonis on kohandatud Pancreatic Cancer Action (2022) ja MedicinePlus (2017) järgi.

Pankreasel on nii eksokriinselt kui ka endokriinselt talitlevad osad. Suurem osa pankrease rakkudest on eksokriinsed, sekreteerides seedeensüüme, näiteks peptidaasid, amülaasid ja lipaasid, mis osalevad lipiidide, süsivesikute ja valkude seedimises. Endokriinse osa moodustavad rohkem pankrease sabaosas paiknevad epiteelirakkude kogumikud, Langerhansi saared, milles on beeta-rakud produtseerivad insuliini. Organismi glükoosi metabolismis osalev insuliin võimaldab keha rakkudel glükoosi vastu võtta ja glükoosi organismis glükogeeni või rasvana talletada. Langerhansi saarte alfa-rakud toodavad glükagooni, et ladestatud suhkrut vereringesse toimetada, mida rakud saavad vastavalt vajadusele insuliini kaasabil kasutada. Insuliini puuduse korral on glükoosi ainevahetus

rakkudes häiritud, mistõttu keha rakud jäävad energiapuudusesse ja ei saa normaalselt funktsioneerida. (Lepp jt., 2018)

1.1.2. Inimese pankrease kasvajak

Pankreasevähk on maailmas enam levinud vähitüüpide hulgas 12. kohal. 2020. aastal registreeriti üle maailma 495 000 uut kõhunäärmevähi juhtumit (World Cancer Research Fund). Eestis on kõhunäärmevähk samuti üks sagedamini esinevaid pahaloomulisi kasvajakid nii meeste kui naiste hulgas (Eesti Vähiliit). 2020. aasta Eesti statistika järgi oli uusi raporteeritud juhtumeid meeste hulgas 115 ja naiste hulgas 159. Aastatel 2016-2020 oli viie aasta suhteline elulemus Eestis 8% (Zimmermann jt., 2023).

Kõhunäärmevähi diagnoosimise teeb raskeks asjaolu, et varases arengujärgus ei esine vähile iseloomulikke sümptomeid või sarnanevad sümptomid mõnede teiste ülakõhuorganite haigustega (Tartu Ülikooli Kliinikum). Seetõttu diagnoositakse kõhunäärmevähk patsientidel sageli alles hilises staadiumis ning haiguse retsidiivsus on 80% (Mouratidis jt., 2021).

Kõhunäärmevähi tekkepõhjusteks peetakse diabeeti, kroonilist pankreatiiti, pankrease tsüste ja geneetilist eelsoodumust kasvajakite arengut soodustavate mutatsioonide tekkeks. Muud riskitegurid on näiteks suitsetamine, alkoholi kuritarvitamine, ülekaalulisus, metaboolne sündroom, vananemine ja pidev tööalane kokkupuude nikliga (Wang jt., 2021).

Kõige sagedasem ja kõige progressiivsem pankreasevähi vorm on pankreasejuha adenokartsinoom (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC), mis moodustab umbes 90% kõikidest pankreasevähi juhtudest (Stoffel jt., 2023; Sumiyoshi jt., 2023).

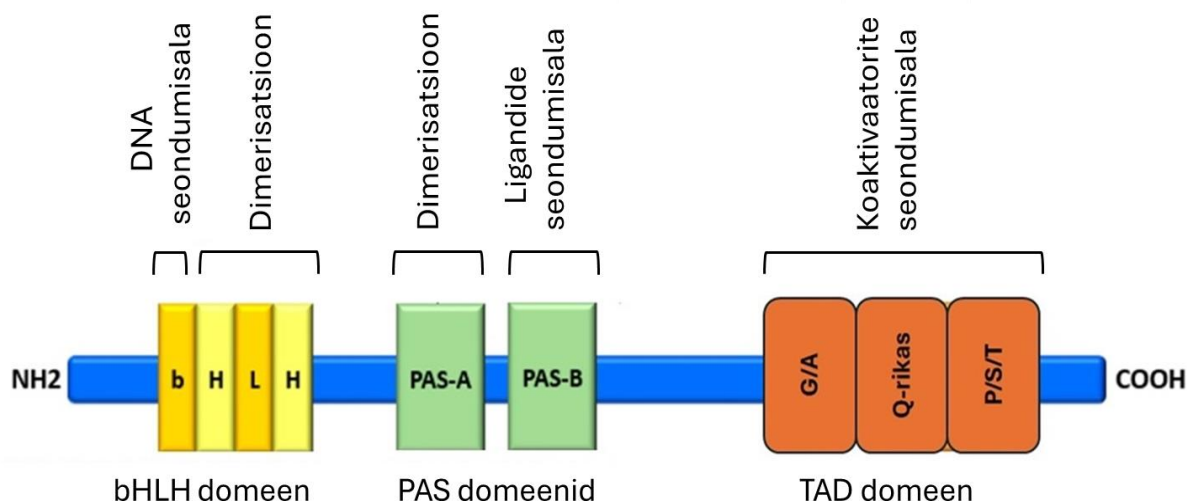
PDAC-i puhul on kõige sagedamini kirjeldatud mutatsioone *KRAS* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue*) ja *GNAS* (*GNAS complex locus*) onkogeenides ning *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), *TP53* ja *SMAD4* (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) tuumorsupressor geenides (Wood jt., 2019). *KRAS* onkogeeni muteerumisel PDAC-is on kõige sagedamini kirjeldatud 2. ja 3. eksoni asendusmutatsioone (>90%), mistõttu on ära rikutud mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasi (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) signaalirada ning on häiritud kontroll rakkude jagunemise üle (Wood jt., 2019). Tuumorsupressor geeni *CDKN2A* poolt kodeeritud valk p16 on 90% juhtudest inaktiveeritud mutatsiooni või homoloogilise rekombinatsiooni tagajärjel (Caldas jt., 1994). Geeni *TP53*, mis kodeerib tuumorsupressor valku p53, tekkivate asendusmutatsioonide tagajärjel vaigistatakse teine

alleel, mis loob eelsoodumuse kasvajate tekkeks (Scarpa jt., 1993). Pooltel PDAC-i juhtudest on mutatsiooni tõttu häiritud SMAD4 funktsioon ning seda on seostatud kasvaja kiire arengu, metastaseerumise ja patsiendi halvema elulemusega (Racu jt., 2022; Wood, 2019). SMAD4 signaalirajas osalevad transformeeriv kasvufaktor beeta (*transforming growth factor β* , TGF β) ja luu morfogeneetiline valk (*bone morphogenetic protein*, BMP), mis on seotud kasvaja epiteeliaalsest rakutüübist mesenhümaalseks üleminekuga (EMT) (Racu jt., 2022).

1.2. Arüülsüivesinike retseptor

1.2.1. Arüülsüivesinike retseptori struktuur

Inimese arüülsüivesinike retseptori (*aryl hydrocarbon receptor*, AHR) geen paikneb 7. kromosoomis ja koosneb 11 eksonist, millelt transkribeeritakse 6243 aluspaari pikkune mRNA (Ensemble). AHR valk koosneb 848 aminohappest ning on jagatud kolmeks domeeniks (Joonis 2) (Hanieh jt., 2023; Uniprot).



Joonis 2. Inimese AHR valgu struktuur. Kohandatud Hanieh jt, (2023) järgi.

Esimeses N-terminaalses domeenis asuv heeliks-ling-heeliks (bHLH) motiiv koosneb kahest funktsionaalsest konserveerunud alast: „b“ regioon, mis seondub DNA-ga ja heeliks „HLH“ regioon, mis soodustab dimerisatsiooni teiste valkudega (Hanieh jt., 2023). Lisaks sisaldab bHLH regioon tuuma ja tsütoplasma transpordiks vajalikku tuuma lokaliseerimise signaali (*nuclear localization signal*, NLS) ja tuuma ekspordi signaali (*nuclear export signal*, NES) (Ikuta jt., 1998). Teise domeeni AHR-is moodustavad kaks Per-ARNT-Sim (PAS) domeeni PAS-A ja PAS-B. PAS-A osaleb dimerisatsioonil teiste valkudega ning PAS-B vahendab AHR-i seondumist liganditega

(Hanieh jt., 2023). Kolmandas C-terminaalses domeenis asuv transaktivatsiooni domeen (*transactivation domain*, TAD) koosneb kolmest järgnevast alamdomeenist: glutamaadi ja aspartaadi rikas piirkond (G/A), glutamiini rikas piirkond (*Q-rich*) ja regioon, mis on rikastatud seriini, treoniini ja proliiniga (P/S/T) (Larigot jt., 2018).

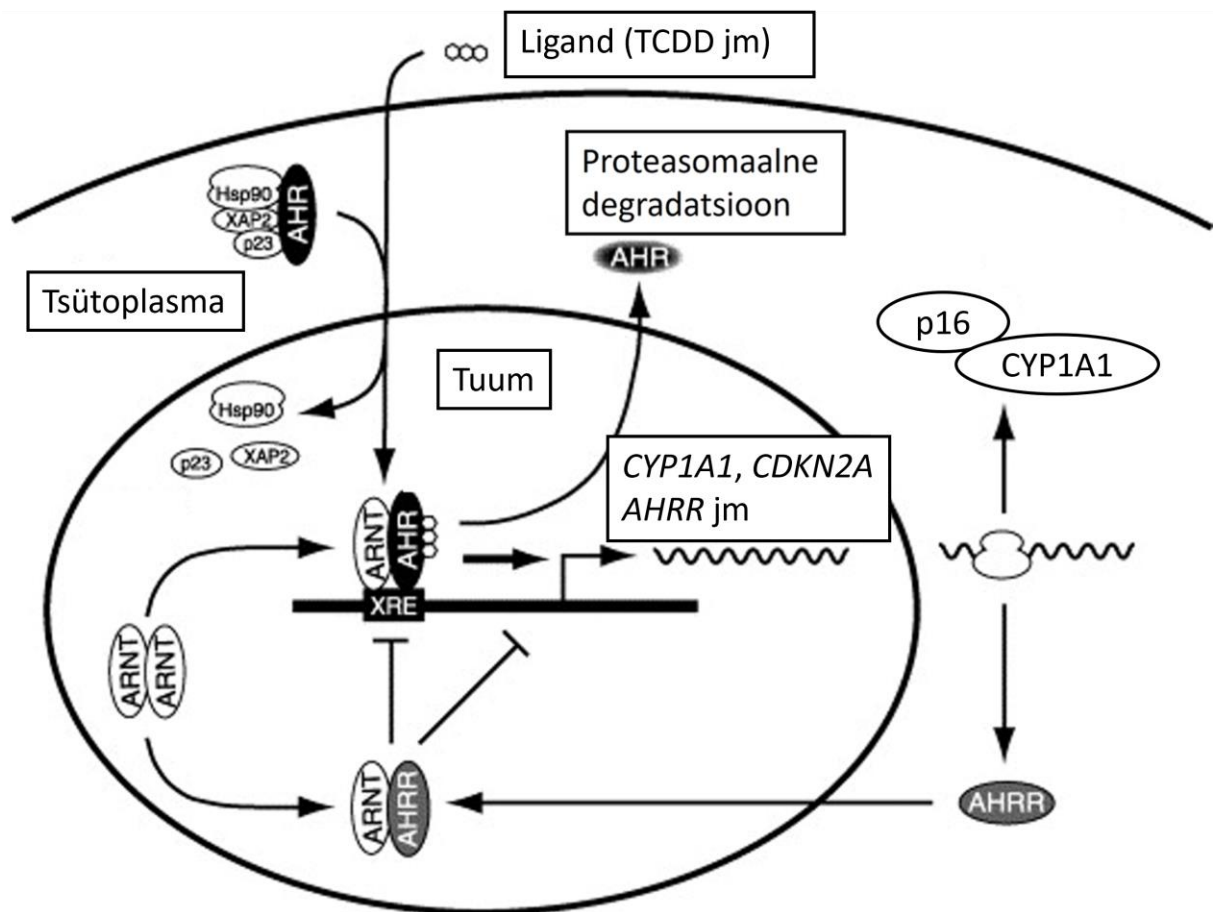
1.2.2. Arüüsüsivesinike retseptori aktivatsioon

AHR-i aktiivsus on kompaktselt reguleeritud erinevate mehhanismide poolt tsütoplasmas ja tuumas (Hanieh jt., 2023). Inaktiivses olekus, ligandi puudumisel, asub AHR tsütoplasmas ja on seotud aktiini filamentide ja mitmete tšaperonidega (HSP90, p23 ja AIP) (Opitz jt., 2023). Kuumašoki valk 90 (*heat shock protein 90*, HSP90) varjab AHR-i DNA seondumisala, säilitades seejuures ligandiga seondumiseks AHR-i õige konformatsiooni ja valk p23 stabiliseerib AHR-i ning tema kofaktorite kompleksi. AHR-iga seonduv valk (*AHR intercalating protein*, AIP), tuntud ka kui B-hepatiidi viiruse X-seoseline valk 2 (*Hepatitis B virus X-associated protein 2*, XAP2), inhibeerib AHR-i ubiquitinatsiooni tsütoplasmas, et vältida AHR-i lagundamist (Stockinger jt., 2014; Kazlauskas jt., 1999).

Ligandi seondumisel tšaperonid ei eemaldu, vaid toimub AHR-i konformatsiooni muutus, mille tulemusena transportvalk, importiin β , seondub AHR-i NLS-iga, initsieerides sellega valgu liikumise tsütoplasmast tuuma (Stockinger jt., 2014).

Tuumas liitub AHR-i ja tšaperonide kompleksiga AHR-i tuuma translokaator (*AHR nuclear translocator*, ARNT), mille tulemuseks on konformatsiooni muutus, tšaperonide vabanemine ja NES järjestuse eksponeerimine (Stocking jt., 2014). ARNT seondumine varjestab NES seondumisala, takistades AHR-i kohest eksporti tsütoplasmasse (Davarinos ja Pollenz, 1999). AHR-ARNT kompleks on võimeline seonduma spetsiifilistele ksenobiootikumi vastuselemendi (*xenobiotic response element*, XRE) järjestustele 5'-TNGCGTG-3' sihtmärkgeenide promootoraladel, milleks on näiteks geenid *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AHRR* (Swanson jt., 1995).

Lisaks teistele geenidele indutseeritakse AHR ja ARNT dimeeri kompleksi poolt ka AHR-i repressori (*AHR repressor*, AHRR) ekspressioon, mis on AHR-i enda aktiivsuse negatiivse tagasiside regulatsioonimehhanism (Stevens jt., 2009). AHRR konkureerib AHR-iga moodustama kompleksi ARNT-iga, mille tulemusena ei teki AHR-ARNT kompleksi ja AHR-i poolt indutseeritud geeniekspressioon surutakse maha (Joonis 3) (Mimura ja Fujii-Kuriyama, 2003).



Joonis 3. AHR-i transkriptsiooni aktivatsiooni mehhanism ja AHR-i negatiivne tagasiside rada AHRR-i poolt. Kohandatud Mimura ja Fujii-Kuriyama (2003) järgi.

Peale sihtmärkgeenide indutseerimist või repressioonimist toimub AHR-i lahkumine XRE järjestuselt ning transport NES järjestuse abil tuumast tsütoplasmasse, kus toimub AHR valgu proteosomaalne degradatsioon. (Davarinos ja Pollenz, 1999).

1.2.3. Arüülsüvesinike retseptori funktsioonid

AHR-i ekspressiooni on kirjeldatud kopsude, neerude, maksa, söögitoru, kõhunäärme, munandi, harknäärme ja võrkkesta kudedes peamiselt epiteelirakkudes (Jiang jt., 2010). Ühtlasi on AHR-i ekspressioon varieeruv sõltuvalt koetüübist või organist (Yin jt., 2016). Hetkel on AHR-il teada üks isovorm, teiste isovormide kohta andmed puuduvad (Uniprot).

Ligand-aktiveeritava transkriptsioonifaktori AHR-i peamiseks eksogeenseteks liganditeks on polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH). Tuntuim PAH on keskkonna kemikaal 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Al-Ghezi jt., 2019). Lisaks eksogeensetele liganditele aktiveerivad AHR-i reguloorset rada ka endogeensed ligandid, milleks üks on kynureniin (*kynurenin*, KYN), mis moodustub trüptofaanist

indoolamiin-2,3-dioksügenaasi (IDO) ja trüptofaani dioksügenaasi (TDO) abil (Wang jt., 2020). KYN soodustab NAD⁺ tootmist trüptofaanist ja vähendab põletikulisi reaktsioone immunoloogiliselt privilegeeritud piirkondades, nagu näiteks silm, aju, platsenta ja käärsool. (Gouasmi jt., 2022).

Kuigi AHR-i kirjeldati esimesena kui ksenobiootikumide metabolismi regulaatorit, on näidatud tema osalust ka mitmetes teistes rakkudele olulistest protsessides, nagu näiteks apoptoos, rakutsükli regulatsioon ja immunoloogilised protsessid (Stevens jt., 2009; Yin jt., 2016). AHR aktiveerib valgu COX2 ekspressiooni, mis osaleb apoptoosi inhibeerimisel. Läbi kaheastmelise reaktsiooni katalüüsib COX2 arahhidoonhappes erinevate prostaglandiini isovormide, nagu näiteks PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF_{2α}, sünteesi. PGE₂ osaleb rakkude apoptoosi inhibeerimisel ja invasioonil, ühtlasi osaleb PGE₂ ka füsioloogilistes protsessides vahendades valu, tundlikkuse, palaviku ja põletiku teket (Sobolewski jt., 2010; Yamaki jt., 2004; Ma jt., 2006).

Tuumorsupressorvalk p53 on rakkudes kirjeldatud apoptoosi indutseerijana ja rakutsükli peatajana suure DNA kahjustuse korral. AHR-i ja p53 seost on näidatud topelt *knock-out* hiirtes (Ahr^{-/-}, p53^{-/-}), kus AHR-i ekspressiooni välja lülitamine tõstis kasvajate esinemissagedust ja vähendas hiirte elulemust võrreldes Ahr^{+/+} p53^{-/-} hiirtega (Phillips jt., 2022). Seda kinnitab asjaolu, et nii AHR kui ka p53 reguleerivad samade rakutsükli kontrollpunktide ja programmeeritud rakusurma reguleerivate valkude transkriptsiooni, näiteks tuumorsupressor p21 ja proapoptoosilised faktorid nagu B-raku lümfoom-2-seoseline X-valk (*B-cell lymphoma-2-associated X protein*, BAX) ning insuliinitaoline kasvufaktoriga seondav valk (*insulin-like growth factor binding protein*, IGFB3) (Elson ja Kolluri., 2023). Ühtlasi on näidatud, et AHR osaleb T-rakkude immuunvastuse väljakujunemisel läbi AHR/IDO/KYN signaalraja, mõjutades näiteks abistaja T-rakkude (*helper T-cells*, Th) tsütokiinide IL-4, IL-5, INF-γ, IL-17A ja IL-22 sekretsiooni, mille tagajärjeks on põletiku, autoimmuunreaktsiooni, immunosupressiooni või immuunresistentsuse teke (Kou ja Dai, 2021).

Rakkude migratsioonil on organismis oluline roll näiteks haava paranemisel, immuunvastuse kujunemisel, kudede morfogeneesis ja regeneratsioonis. Varasemalt on näidatud, et AHR reguleerib hiire tapjarakkude (*natural killers*, NK) migratsiooni Asb2 (*ankyrin repeat and SOCS box protein 2*) valgu ekspressiooni kaudu (Shin jt., 2021). Lisaks on näidatud, et AHR-i signaali üleekspressiooni tulemusena tekivad migratsioonihäired interneuronite arengus, mis võib seletada TCDD poolt põhjustatud neurotoksilisust (Kimura jt., 2016).

Enim kirjeldatud AHR-i sihtmärkgeenideks on tsütokroom P450 perekonda kuuluvad *CYP1A1* ja *CYP1B1*, mis osalevad peamiselt ksenobiootikumide detoksifikatsioonil (Larigot jt., 2018). Samas on näidatud, et AHR indutseerib tugevalt *CYP1A1* ekspressiooni, mis omakorda metaboliseerib mitmeid prokantseroogeenseid ühendeid, nagu näiteks benzo[a]püreeni (benzo[a]pyrene, BaP), mille vaheühendid võivad reageerida DNA-ga ning põhjustada mutageneesi (Murray jt., 2014).

Seoses hiljutise ülemaailmse pandeemiaga on AHR-i suurenenud ekspressiooni seostatud ka koroonaviirusega. Näidati, et SARS-CoV-2 infektsioon käivitab kopsuepiteeli rakkudes AHR-i aktivatsiooni, mis põhjustab lima peamiste makromolekulaarsete komponentide, mutsiinide, üleekspressiooni. Selle tulemusena pakseneb vere-õhu barjäär, mis takistab hapniku difusiooni sissehingatavast õhust verre ning suureneb hüpoksia tekke risk (Liu jt., 2020).

1.2.4. Arüüsüsivesinike retseptori roll kasvajates

Erinevates vähimudelites on kirjeldatud nii AHR-i kasvajaid aktiveerivat kui inhibeerivat rolli. AHR-i suurenenud tase on lisaks pankreasele leitud näiteks kroonilise lümfotsütleukeemia, täiskasvanu T-rakulise leukeemia, rinna-, mao-, pea-, kaela-, neeru- ja kopsuvähi korral (Sherr ja Monti, 2013; Hayashibara jt., 2003; Baker jt., 2020; DiNatale jt., 2012; Ishida jt., 2010; Peng jt., 2009). Reageerides nii eksogeensetele kui endogeensetele liganditele võivad AHR-i suurenenud ekspressiooni tagajärjel tekkinud signaalmolekulid mõjutada raku adhesioonimolekulide ja -signaalide ekspressiooni vähenemist, muutes seeläbi vähirakud liikuvamaks ja invasiivsemaks (Griffith ja Frankel, 2024). Näiteks on rinnavähi rakuliinis MCF7 kirjeldatud, et TCDD poolt aktiveeritud AHR on võimeline katkestama rakkudevahelisi kontakte ning indutseerima vähirakkude migratsiooni *c-Jun* N-terminaalse kinaasi (*c-Jun N-terminal kinase*, JNK) sõltuva signaaliraja kaudu (Diry jt., 2006). AHR-i liigne aktiivsus soodustab SNAI2 (*snail family transcriptional repressor 2*) ekspressiooni suurenemist, mis omakorda pärsib E-kadheriini ekspressiooni. Selle tulemusena väheneb rakkude adhesioon ning tekib kasvajarakkude epiteliaalsest rakutüübist üleminek mesenhümaalseks, mis hõlbustab kasvajarakkude invasiivsust, migratsiooni ja metastaaside teket (Murray jt., 2014). AHR võib kasvajate teket soodustada ka apoptoosi inhibeerimisega. Lisaks ülalpool mainitud apoptoosi inhibeerimisele läbi COX2 ekspressiooni aktivatsiooni, inhibeerib AHR mitmete teiste antiapoptootiliste valkude, nagu näiteks X-seotud apoptoosivalgu inhibiitor (*X-linked*

inhibitor of apoptosis, XIAP) ja B-raku lümfoom 2 (*B-cell lymphoma 2*, BCL-2) aktivatsiooni (Griffith ja Frankel, 2024).

Kiiresti suureneva kasvajarakkude massi jaoks on angiogenees ülioluline, sest sellest sõltub rakkude varustamine hapniku ja toitainetega. Toitainete vähesuse korral suureneb oht kasvaja metastaseerumiseks (Kreuzaler jt., 2020). AHR on võimeline angiogeneesi soodustama mitmesuguste mehhanismide kaudu. Transkriptsiooniliselt aktiivsed AHR-ARNT heterodimeerid interakteeruvad hüpoksiat indutseeritava faktoriga-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α* , HIF-1 α), et ühelt poolt suurendada IL-8 ja veresoonte endoteeli kasvufaktori (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) ekspressiooni, samal ajal alla reguleerides TGF β ekspressiooni, mis soodustab uute veresoonte moodustumist (Roman jt., 2009). Varasemalt on näidatud, et hüpoksia tingimustes muutuvad PDAC-i rakud invasiivsemaks, seda põhjusel, et HIF valgud reguleerivad sihtmärkgeene, mis on seotud angiogeneesi, metabolismi, migratsiooni, invasiooni, immuunvastuse ja ravimresistentsusega (Sun jt., 2015).

Kui valdavalt on levinud arusaam, et kasvajate teket põhjustab pigem AHR-i aktivatsioon, siis tegelikult on kirjeldatud ka AHR-i kasvajaid inhibeerivat rolli kopsu-, eesnäärme-, maksa- ja nahavähi mudelites (Elson ja Kolluri, 2023). Wnt/ β -kateniini signaalirada on kriitilise tähtsusega embrüonaalses arengus ja täiskasvanud kudede homöostaasis (Liu jt., 2022). Näiteks maksa- ja soolevähi mudelites näidati, et AHR-i aktiivsuse kadumine soodustas Wnt signaaliraja suurenenud aktiivsust ning tuumorogeneesi tõusu (Elson ja Kolluri, 2023). Lee jt (2016) näitasid, et ligandist sõltumatu AHR on võimeline pärssima kopsuvähi rakkude H1299 invasiooni. Ligandiga mitteseotud üleekspressioonid AHR seostus tsütoplasmas SMAD4 ja Jun-aktivatsiooni domeeni siduva valguga (*Jun-activation domain binding protein*, JAB1), et kutsudes sellega esile SMAD4 ubikvitinatsiooni ja proteasomaalse lagundamise. Selle tulemusena reguleeriti alla ka TGF β signaaliülekannderaja aktiivsus ning vähenes metastaaside teke EMT vähenemise kaudu (Lee jt., 2016).

AHR-i rolli tõttu kasvajate arengus peetakse teda potentsiaalseks terapeutiliseks sihtmärgiks, kuna AHR-i ligandid võivad pärssida vähirakkude proliferatsiooni ja migratsiooni, indutseerida rakkude diferentseerumist ning soodustada apoptoosi (Elson ja Kolluri, 2023). Hetkel on käimas erinevad AHR-iga seotud kliinilised vähiravimite katsed. 2022 aasta faas 1 katses (NCT04069026) kirjeldati AHR-i antagonistid BAY2416964 kasutamisel esialgset kasvajakasvatust toimet (Dumbrava jt., 2023). Lisaks on faas 1 katses AHR-i antagonistid SR-1 (NCT04200963) ja IK-175 (NCT02765997).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgid olid:

1. Võrrelda AHR-i agonistide (TCDD ja KYN) ja antagonisti (BAY) mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile.
2. Võrrelda, kas AHR-i antagonisti ja agonisti töötlusel on erinev mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile hüpoksia tingimustes (20% CO₂) võrreldes normaalsete kasvutingimustega (5% CO₂).

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Inimese pankreasevähi rakuliinide kasvatamine

Töös kasutati inimese PDAC-i rakuliine BxPc-3 ja SU.86.86, mis saadi koostööpartneritelt Leedu Terviseteaduse Ülikoolist. Rakke kasvatati RPMI 1640 söötmes 100 mm koekultuuri tassidel (Corning Inc.), mis sisaldas L-glutamiini ja 25 mM HEPES-t (Corning Inc.), 10% veise loote seerumit (*fetal bovine serum*, FBS) (Thermo Fisher Scientific Inc.) ja 1% penitsilliini-streptomütsiini (lõppkontsentratsioon 100 U/mL penitsilliini ja 100 µg/mL streptomütsiini) (Capricorn Scientific). Rakke kasvatati inkubaatoris temperatuuril 37°C ja 5% või 20% CO₂ tingimustes. Söötme vahetamiseks või rakkude passeerimiseks eemaldati tassidelt vana sööde ja pesti rakke 1x PBS lahusega (Corning Inc.). Pärast PBS-i eemaldamist lisati rakkudele 2 mL trüpsiini (Corning Inc.) ja inkubeeriti 5 min 37 °C juures vastavalt 5% või 20% CO₂ tingimustes. Tassidelt lahti tulnud rakud korjati RPMI 1640 söötmega tuubi ja tsentrifuugiti toatemperatuuril kiirusega 293 RCF-i 5 min. Pärast supernatandi eemaldamist suspendeeriti rakud 10 mL RPMI 1640 kasvusöötmes ning külvati uuele tassile või tassidele.

2.2.2. Rakkude migratsioonivõime hindamine

Rakkude migratsiooni hinnati kasutades 8.0 µm poori suurusega Greiner Bio-One ThinCert™ koekultuuri kambreid (Fisher Scientific). BxPc-3 ja SU.86.86 rakud külvati 6-kannuliste plaatidele tihedusega 100 000 rakku kannu kohta. Rakkude arvu hinnati kasutades automatiseeritud lugemismasinat Countess™2 (Thermo Fisher Scientific Inc.) ning spetsiaalseid lugemisplaate (Thermo Fisher Scientific Inc.). Lugemisplaadi ühte pesa pipeteeriti 5 µL rakisuspensiooni ja 5 µL 0.4% trüpaansinise (Thermo Fisher Scientific Inc.) segu.

BxPc-3 ja SU.86.86 rakke inkubeeriti 24h antagonistiga (BAY, 10 μ M) ja agonistidega (KYN, 150 μ M; TCDD 10 nM). Kontrollina kasutati töötlemata (NT) ja DMSO-ga töödeldud rakke. Pärast inkubatsiooni kanti 15 000 rakku 350 μ l seerumita kasvusöötmes Greiner Bio-One ThinCert™ koekultuuri kambrisse, mis omakorda asetati 24-kannulisele koekultuuri plaadile. Kambri alla kannu põhja lisati 750 μ l seerumit sisaldavat kasvusöödet. Rakke inkubeeriti 24 tundi 37°C ja 5% CO₂ juures.

Greiner Bio-One ThinCert™ koekultuuri kambrites olevad rakud fikseeriti 1 mL 4% paraformaldehüüdiga 3 min toatemperatuuril, seejärel pesti kaks korda 1x PBS-iga ning permeabiliseeriti 1 mL metanooliga 20 min toatemperatuuril. Pärast kahekordset pesu PBS-iga, värviti rakud mikroskoobi all visualiseerimiseks 1 mL *Coomassie Blue* lahusega (0,4% mg *Coomassie® Brilliant Blue G 250*, 10% sidrunhape, 8% ammonium sulfaat, 20% metanool). Plaat kaeti fooliumiga ja inkubeeriti 20 min toatemperatuuril pimedas. Järgnevalt pesti kambreid MQ veega kaks korda ja membraanist mitte läbi liikunud rakud eemaldati kambrist ettevaatlikult niisutatud vatitikuga. Piltide tegemiseks kasutati Eclipse T100 (Nikon®) mikroskoopi ja 20x suurendust. Igast kambrist tehti vähemalt 8 pilti erinevatest asukohtadest. Rakkude lugemiseks kasutati ImageJ (versioon 1.8.0) programmi, kus nummerdati värvunud rakud ühekaupa. Katse viidi mõlema rakuliini puhul läbi kolmes korduses.

2.2.3. *In vitro* kraape-meetodil haava paranemise katse

Rakud BxPc-3 ja SU.86.86 külvti 6-kannulisele plaadile ja kasvatati kuni konfluentsuse saavutamiseni. Konfluentsetelt rakkudest eemaldati vana sööde ja lisati seerumita sööde, millega inkubeeriti rakke 2 tundi. Seejärel tõmmati 200 μ l steriilse pipetiotsikuga umbes 250 μ m laiune rakuvaheala, nn „haav“ ning rakkudele lisati kolmes erinevas kontsentratsioonis antagonistiga sisaldavat seerumita sööde (BAY 0,1 μ M; BAY 1 μ M; BAY 10 μ M) ja agonist (TCDD, 10 nM). Kontrollina kasutati kemikaalivabas seerumita söötmes (NT) ja DMSO-ga inkubeeritud rakke.

Koheselt pärast „haava“ tekitamist pildistati rakke Eclipse T100 (Nikon®) mikroskoobiga kasutades 10x suurendust. „Haava“ asukoht märgistati markeriga ning „haava“ kinnikasvamise jälgimiseks tehti „haavast“ pildid iga 24 tunni järel. Piltide analüüsimiseks kasutati ImageJ (versioon 1.8.0) programmi, mille abil mõõdeti iga 24h järel rakuvaheala. Rakuvaheala normaliseeriti esialgse haava suuruse suhtes. Katse viidi mõlema rakuliini puhul

läbi viies korduses. Tulemusi võrreldi „haava“ algse suuruse suhtes ja väljendati „haava“ kinni kasvamise protsendina.

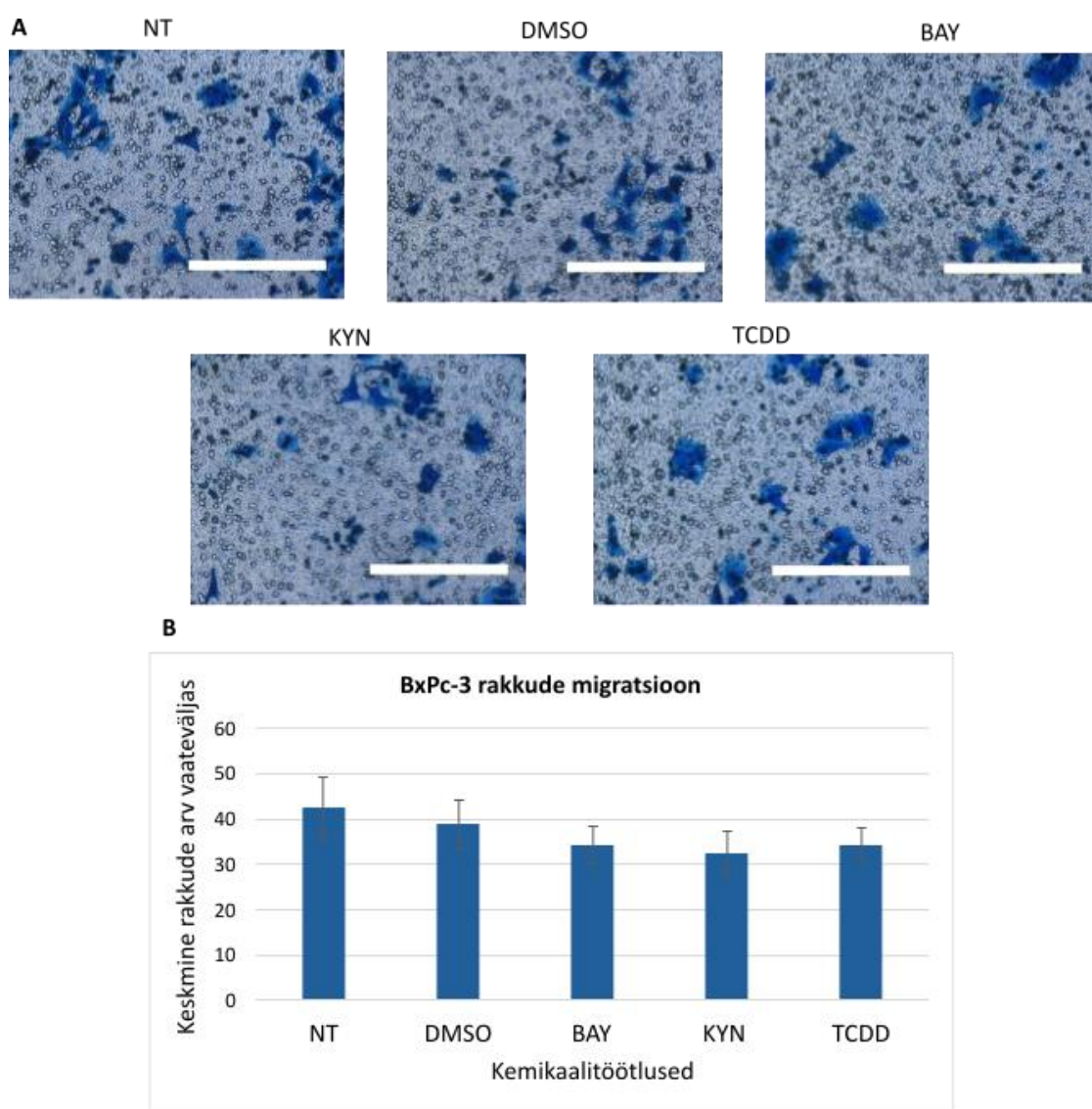
2.2.4. Andmeanalüüs

Käesolevas bakalaureusetöös korrati igat katset vähemalt kolm korda. Tulpdiagrammidel on tulemuste keskväärtused koos 95% usaldusintervallidega. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati kahepoolset sõltumatut (tüüp 2) Studenti t-testi Microsoft Excelis (versioon 2403). Statistilise olulisuse nivooks loeti P-väärtust $< 0,05$.

2.3. TULEMUSED

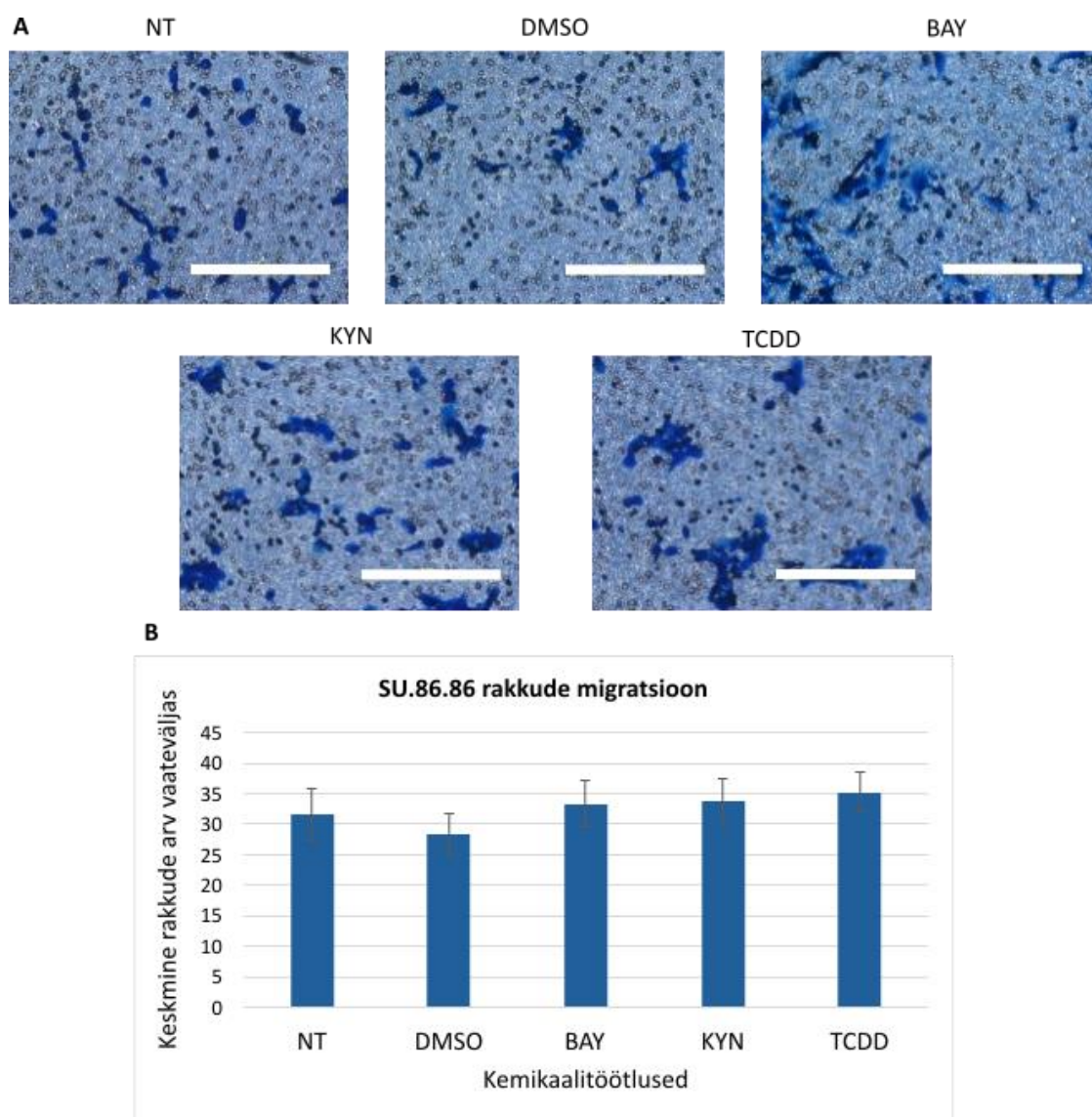
2.3.1. AHR-i antagonisti ja agonistide mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonivõimele

Varasemad uurimused on näidanud, et suurenenud AHR-i ekspressioon soodustab kasvajakude migratsiooni ja invasiooni, mille tulemusena võivad tekkida metastaasid, ravimresistentsus ja immuunvastuse häired. Selle tulemuseks on see, et vähktõvega patsiendid vajavad invasiivseid kirurgilisi protseduure, nende ravivõimalused ja elulemus vähenevad (Griffith ja Frankel 2024; Murray jt., 2014). Seega on vaja põhjalikumalt arusaama kasvajakude migratsiooni soodustavatest teguritest, et leida potentsiaalselt tõhusaid terapeutilisi sihtmärke.



Joonis 4. AHR antagonisti ja agonistide mõju BxPc-3 rakkude migratsioonile. BxPc-3 rakkude näitlikud pildid koekultuuri kambris tehtud migratsiooni katsest, kasutades antagonisti (BAY, 10 μ M) ja agoniste (KYN, 150 μ M; TCDD, 10 nM), mõõtkava vastab 500 μ m-le (A). Rakkude keskmine arv vaateväljas (B).

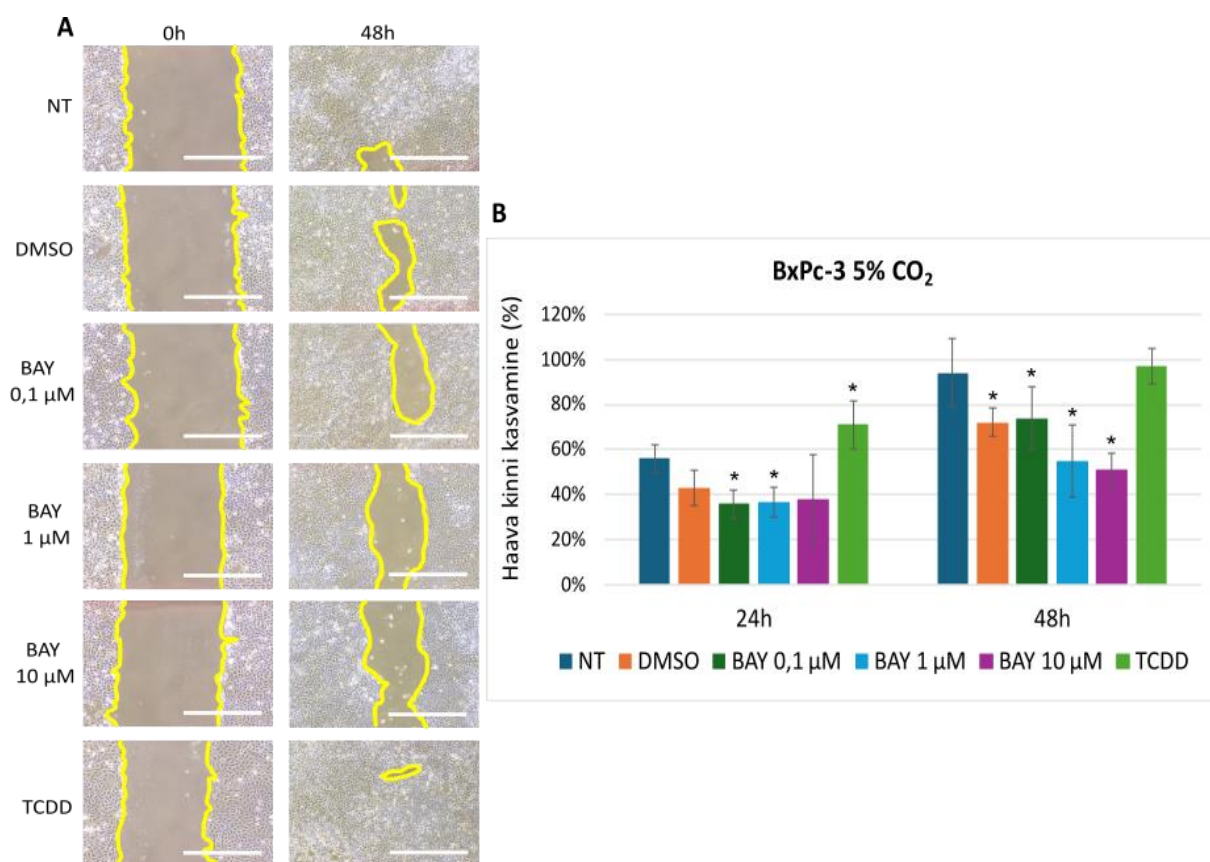
Töös kasutatud PDAC-i päritoluga BxPc-3 ja SU.86.86 rakuliinides on varasemate uuringute kohaselt detekteeritud kõrge AHR-i valgu ja mRNA tase (Konsa, 2021). Käesolevas töös uuriti, kas AHR-i agonistid ja antagonist mõjutavad kasvajakakkude migratsiooni 3D Greiner Bio-One ThinCert™ koekultuuri kambrites. Katse tulemused näitasid, et kasutatud kemikaalid ei mõjutanud BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonivõimet. Agonistid ja antagonist käitusid mõlema rakuliini puhul sarnaselt, mis tähendab, et ei tekkinud kasvajakakkude migreerumise erinevusi AHR-i aktivaatorite ja inhibiitori toime vahel. Statistiliselt olulist erinevust töötlemata rakkude ja töödeldud rakkude vahel ei olnud (Joonis 4B ja 5B).



Joonis 5. AHR antagonisti ja agonistide mõju SU.86.86 rakkude migratsioonile. SU.86.86 rakkude näitlikud pildid koekultuuri kambri tehtud migratsiooni katsest, kasutades antagonist (BAY, 10 μ M) ja agoniste (KYN, 150 μ M; TCDD, 10 nM), mõõtkava vastab 500 μ m-le (A). Rakkude keskmine arv vaateväljas (B).

2.3.2. AHR-i antagonisti ja agonisti mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile normaal- ja hüpoksia tingimustes.

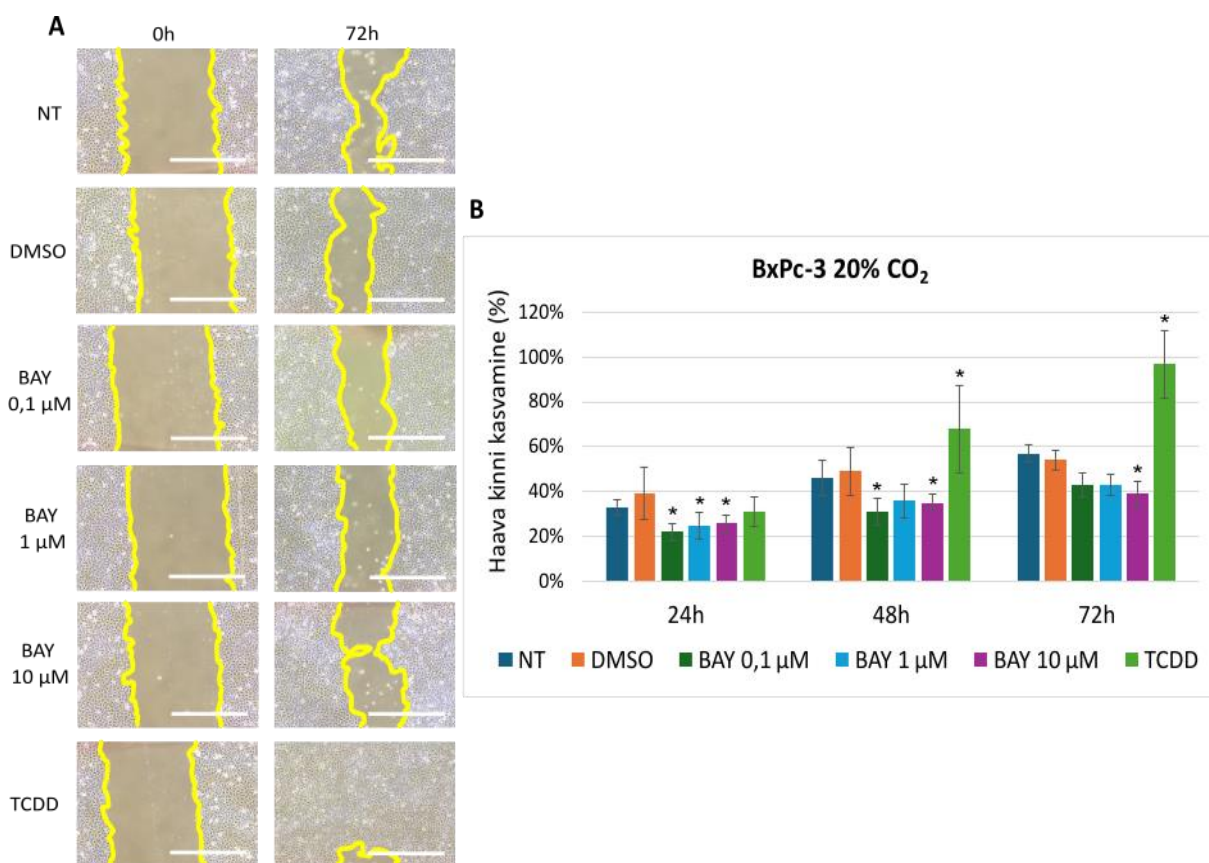
Lisaks uuriti ka rakkude migratsiooni 2D *in vitro* kraape-meetodil haava paranemise katsega. Sun jt (2015) uuringus näidati, et hüpoksia soodustab PDAC-i rakuliini CaPan2 rakkude migratsiooni (Sun jt., 2015). Antud katse eesmärk oli teada saada, kas AHR-i antagonisti ja agonisti tootlusel on erinev mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile hüpoksia (20% CO₂) kasvutingimustes ja normaaltingimustes (5% CO₂). Samades katsetingimustes uuriti lisaks kemikaali BAY erinevate kontsentratsioonide mõju.



Joonis 6. AHR antagonisti ja agonisti mõju BxPc-3 rakkude haava paranemisele 5% CO₂ tingimustes. BxPc-3 rakkude näitlikud pildid *in vitro* kraape-meetodil haava paranemise katsest 5% CO₂ kasvutingimustes, kasutades antagonisti (BAY, 0,1 μM; BAY 1 μM; BAY, 10 μM) ja agonisti (TCDD, 10 nM), mõõtkava vastab 250 μm-le (A). Haava kinni kasvamine (%)(* P < 0,05 vs NT) (B).

Ekspereimendi tulemus näitas, et CO₂ erinev kontsentratsioon kasvukeskkonnas mõjutas BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsiooni. Kõige paremini oli see väljendunud BxPc-3 rakkude puhul, kus 5% CO₂ tingimustes toimus “haava kinni kasvamine” NT rakkude ja TCDD-ga töödeldud

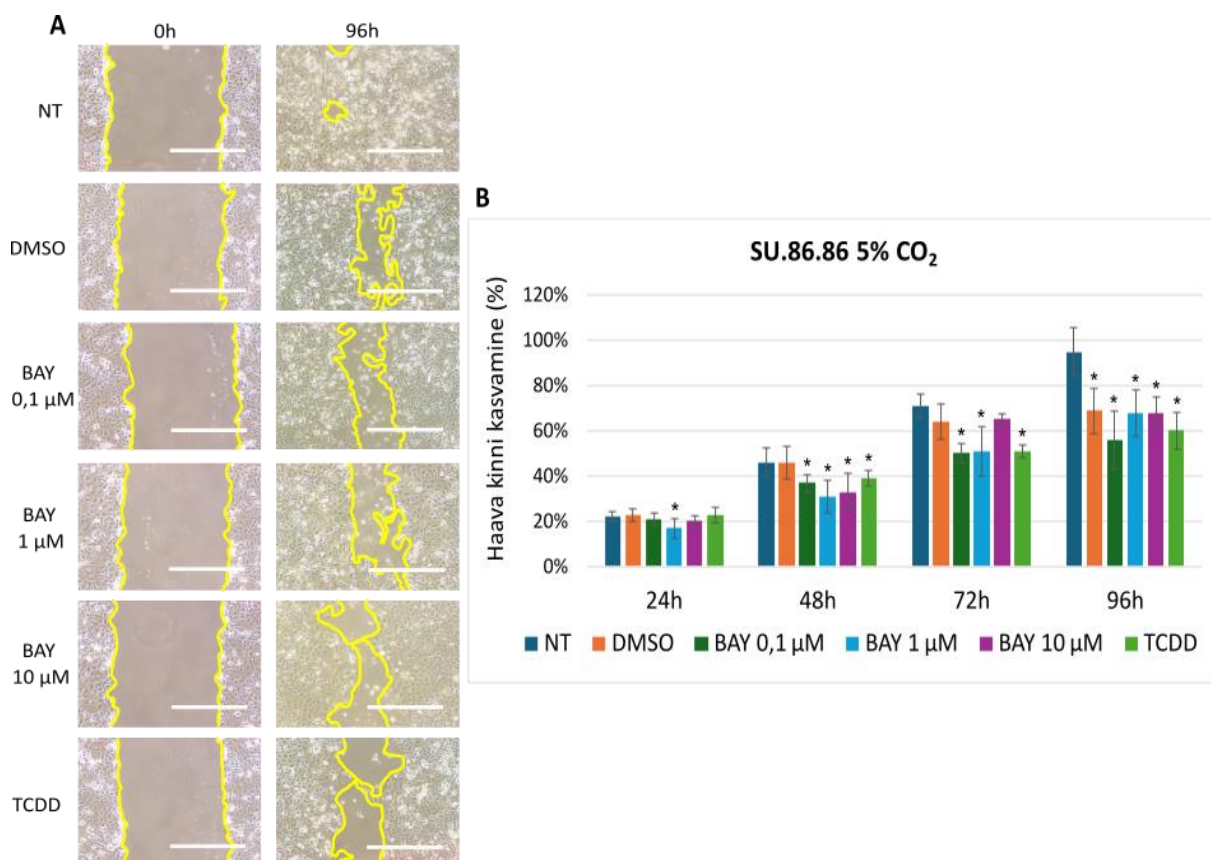
rakkudega 48 tundi, samas 20% CO₂ tingimustes kulus TCDD-ga töödeldud rakkudel 72 tundi. NT rakkude migratsioon oli 20% CO₂ juures märgatavalt aeglasem võrreldes 5% CO₂-ga. Samuti oli BxPc-3 rakkude migratsioon 20% CO₂ juures aeglasem DMSO töötuse ja kõikide kasutatud BAY kontsentratsioonide korral. SU.86.86 NT rakkudel läks 5% CO₂ juuresolekul “haava kinni kasvamiseks” aega 96 tundi. 20% CO₂ tingimustes lõpetati katse 96 tunni järel, sest rakud enam ei migreerunud ja tassidele tekkis ohtralt surnud rakke.



Joonis 7. AHR antagonisti ja agonisti mõju BxPc-3 rakkude haava paranemisele 20% CO₂ tingimustes. BxPc-3 rakkude näitlikud pildid *in vitro* kraape-meetodil haava paranemise katsest 20% CO₂ kasvutingimustes, kasutades antagonisti (BAY, 0,1 μM; BAY 1 μM; BAY, 10 μM) ja agonisti (TCDD, 10 nM), mõõtkava vastab 250 μm-le (A). Haava kinni kasvamine (%)(* P < 0,05 vs NT) (B).

5% CO₂ kasvutingimustes migreerusid BAY-ga (0,1 μM; 1 μM; 10 μM) töödeldud BxPc-3 rakud 48 tunniga märgatavalt vähem võrreldes töötlemata rakkudega. Migratsioonikiirus vähenes vastavalt 0,79, 0,59 ja 0,54 korda. Tulemused on statistiliselt olulised (P < 0,05). BAY (0,1 μM ja 1 μM) keskvaärtused koos 95% veapiiridega on võrdväärsed DMSO-ga, mistõttu ei saa kindlalt väita, et tegemist on BAY inhibeeriva mõjuga migratsioonile, vaid pigem on tegemist DMSO efektiga. Kuigi esimesel päeval on näha TCDD suurendavat mõju rakkude

migratsioonile, siis 48 tunni pärast on see ühtlustunud ning võrdväärne NT rakkudega (Joonis 6B).

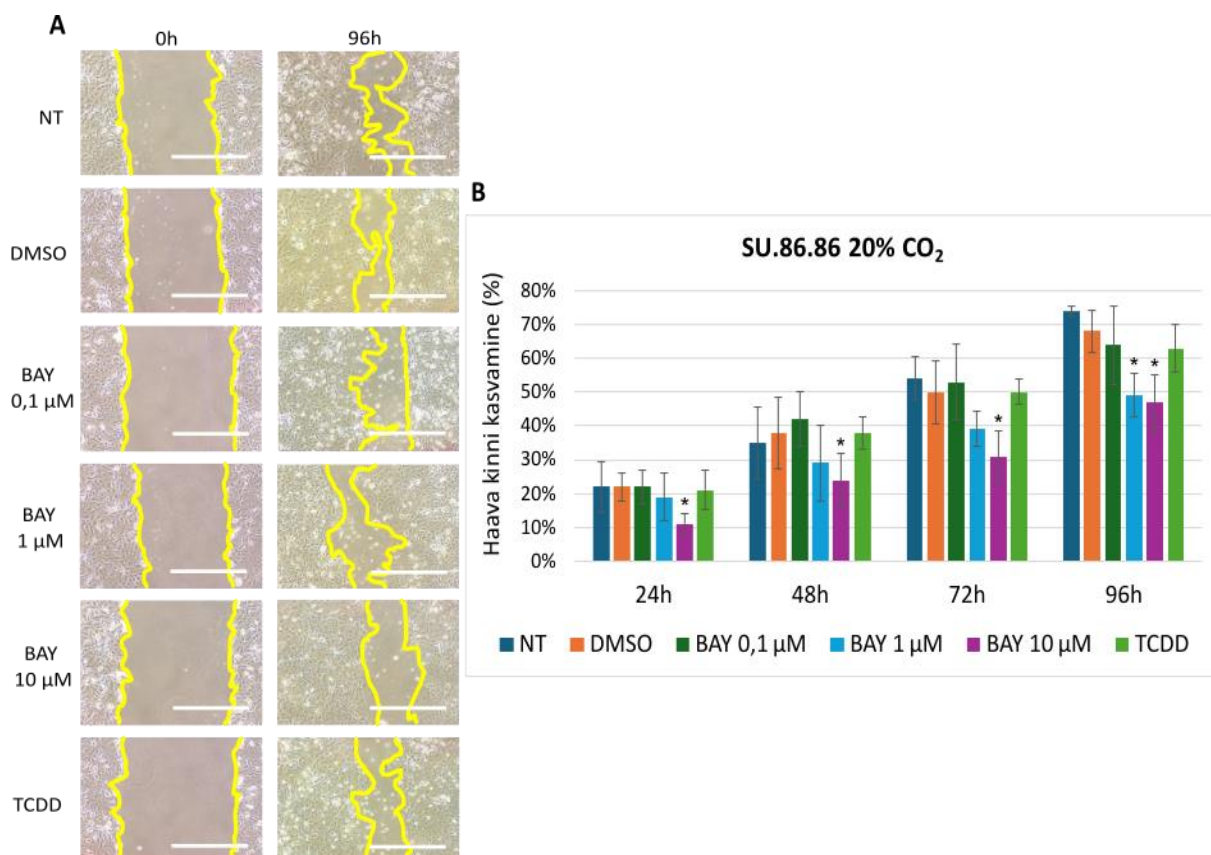


Joonis 8. AHR antagonisti ja agonisti mõju SU.86.86 rakkude haava paranemisele 5% CO₂ tingimustes. SU.86.86 rakkude näitlikud pildid *in vitro* kraape-meetodil haava paranemise katsest 5% CO₂ kasvutingimustes, kasutades antagonisti (BAY, 0,1 μM; BAY 1 μM; BAY, 10 μM) ja agonisti (TCDD, 10 nM), mõõtkava vastab 250 μm-le (A). Haava kinni kasvamine (%)(* P < 0,05 vs NT) (B).

20% CO₂ kasvutingimustes migreerusid BAY-ga (0,1 μM; 1 μM; 10 μM) töödeldud BxPc-3 rakud võrreldes NT-ga vastavalt 0,75, 0,75 ja 0,68 korda aeglasemalt, millest statistiliselt olulise tulemuse andis 10 μM kontsentratsiooniga BAY (P < 0,05). TCDD-ga töödeldud BxPc-3 rakud migreerusid 72 tunniga märgatavalt rohkem võrreldes NT rakkudega (Joonis 7B). Migratsioonikiirus suurenes 1,7 korda. Tulemus oli statistiliselt oluline (P < 0,05).

5% CO₂ kasvutingimustes migreerusid DMSO, BAY (0,1 μM; 1 μM; 10 μM) ja TCDD-ga töödeldud SU.86.86 rakud 96 tunniga märgatavalt vähem võrreldes NT rakkudega (Joonis 8B). Migratsioonikiirus vähenes vastavalt 0,73, 0,59, 0,72, 0,72 ja 0,63 korda. Tulemused olid statistiliselt olulised (P < 0,05). Kuigi efekt oli märgatav, olid tulemuste keskvaärtused koos veapiiridega DMSO-ga töödeldud rakkudega samaväärsed, mistõttu oli tõenäoliselt tegemist

DMSO efektiga. Nendes tingimustes AHR-i agonisti ja antagonistiga töötusel SU.86.86 rakkudele erinevat migratsiooni efekti ei olnud.



Joonis 9. AHR antagonisti ja agonisti mõju SU.86.86 rakkude haava paranemisele 20% CO₂ tingimustes. SU.86.86 rakkude näitlikud pildid *in vitro* kraape-meetodil haava paranemise katsest 20% CO₂ kasvutingimustes, kasutades antagonistiga (BAY, 0,1 μM; BAY 1 μM; BAY, 10 μM) ja agonisti (TCDD, 10 nM), mõõtkava vastab 250 μm-le (A). Haava kinni kasvamine (%) (* P < 0,05 vs NT) (B).

20% CO₂ kasvutingimustes migreerusid BAY-ga (1 μM ja 10 μM) töödeldud SU.86.86 rakud 96 tunniga märgatavalt vähem võrreldes NT rakkudega (Joonis 9B). Migratsioonikiirus vähenes vastavalt 0,66 ja 0,64 korda. Tulemused olid statistiliselt olulised (P < 0,05). BAY-ga (10 μM) töödeldud rakkude migratsiooni võimekuse vähenemist oli märgata juba 24 tunni jooksul. DMSO, BAY (0,1 μM) ja TCDD-ga töödeldud rakkude puhul ei tekkinud märgatavat migratsiooniaktiivsuse muutust võrreldes NT rakkudega isegi 96 tunni möödudes.

2.4. ARUTELU

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida, kas AHR-i agonistid (KYN ja TCDD) ja antagonist (BAY) mõjutavad PDAC-i rakuliinide BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsiooni. Toitainete vaeguse ja hapniku puuduse tulemusel võib suurenda kasvajakude migratsiooniaktiivsus, mis omakorda võib viia metastaaside tekkeni (Suhail jt., 2019). Lisaks väheneb migratsiooni tulemusena lokaalsete ravimeetodite efektiivsus ja suureneb retsidiivsus (Griffith ja Frankel 2024). Erinevad uuringud on näidanud, et AHR on potentsiaalne sihtmärk, kuna osaleb erinevates rakkudele olulistes protsessides ning AHR-i aktiveerivat kui inhibeerivat rolli on kirjeldatud erinevates kasvajates ja kasvajakuliinides (Hanieh jt., 2023). Sellest tulenevalt on antud teemat vaja uurida, et põhjalikumalt aru saada kasvajakude migratsiooni ja invasiooni soodustavatest teguritest ning leida potentsiaalselt tõhusaid terapeutilisi sihtmärke kasvajakavastaseks raviks.

Käesolevas töös kasutati kasvajakude migratsiooni hindamiseks 3D Greiner Bio-One ThinCert™ koekultuuri kambreid. AHR-i agonistide ja antagonistide töötamise tulemused BxPc-3 ja SU.86.86 rakkudega ei näidanud statistiliselt olulist mõju võrreldes töötlemata rakkudega. Antud katse tulemused ei kinnita Diry jt (2006) ning Peng jt (2009) tulemusi, mis näitasid, et TCDD-ga töödeldud rakkudel suureneb migratsiooniaktiivsus (Diry jt., 2006; Peng jt., 2009). Kuna erinevate kasvajatüüpide tekkemehhanismid on erinevad, siis viitab antud töös saadud tulemus sellele, et kasutatud BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude puhul kasvaja tekkemehhanism ei ole otseselt seotud AHR-iga ja AHR-i ekspressiooni suurenemine on pigem selle protsessi tagajärg. Teiseks võib nende rakkude migratsiooniaktiivsus olla juba maksimaalne ning TCDD-ga rakkude töötlemine seda enam ei suurenda. Tõenäoliselt samadel põhjustel ei mõjutanud selles katses ka antagonist (BAY) BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsiooni.

Teiseks eesmärgiks oli võrrelda, kas AHR-i antagonist ja agonisti töötamisel on erinev mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile 20% ja 5% CO₂ kasvutingimustes. Lisaks sooviti näha ka erineva BAY kontsentratsiooni mõjusid, kuna BAY faas 1 kliinilise katse esialgses publikatsioonis oli kontsentratsiooniline mõju alles uurimisel (Dumbrava jt., 2023; kliiniline katse NCT04069026). Selleks tehti 2D *in vitro* kraape-meetodil haava paranemise katse. Varasemalt on antud katset tehtud erinevate töötlustega ning saadud, et AHR on oluline BxPc-3 rakuliini vähirakkude kasvuks, SU.86.86 rakuliini vähirakkude puhul erinevust ei täheldatud (Stukas jt., 2023).

Eksperimendi tulemused näitasid, et 20% CO₂ juuresolekul vähenes migratsioon mõlema rakuliini puhul. See viitab sellele, et lisastress 20% CO₂ kontsentratsiooni näol mõjutab rakkude migratsiooniaktiivsust. Meie laboris on varasemalt näidatud, et 20% CO₂ tingimustes väheneb COX2 geeni ekspressioon (COX2 normaaltingimustel aitab rakkudel vältida apoptoosi). See võib selgitada, miks rakud migreerusid vähem ja surnud rakke oli tassidel rohkem.

20% CO₂ kasvutingimustes BxPc-3 rakkude puhul muutus migratsiooniaktiivsus haava kinni kasvamiseks 48-lt tunnilt 72-le. SU.86.86 rakkude puhul 20% CO₂ tingimustes lõpetati katse 96 tunni järel, sest rakud enam ei migreerunud ja tassidele tekkis ohtralt surnud rakke. Antud tulemused BxPc-3 ja SU.86.86 rakkudega ei kinnita Sun jt., (2015) tulemusi, mis näitasid, et hüpoksia tingimustes suureneb kasvajakude migratsioon (Sun jt., 2015).

Kui võrreldi 5% ja 20% CO₂ kasvutingimustes inkubeeritud TCDD (10 nM) ja BAY-ga (0,1 µM; 1 µM; 10 µM) töödeldud BxPc-3 rakke selgus, et TCDD mõjutas rohkem migratsiooniaktiivsust 20% CO₂ juuresolekul. 5% CO₂ juuresolekul oli TCDD-ga töödeldud rakkude migratsiooniaktiivsus samaväärne NT-ga, antud tulemus viitab sellele, et kasvajakude migratsioon võib olla juba maksimaalne, mistõttu aktivaatori lisamisel (TCDD) migratsioon ei suurene. Saadud tulemus on kooskõlas varasema katse tulemusega (Konsa, 2021). Samas oli näha, et BxPc-3 rakud olid 20% CO₂ juuresolekul TCDD suhtes vastuvõtlikumad võrreldes NT rakkudega. BAY-ga (10 µM) töödeldud rakud näitasid mõlema kasvutingimuse korral väiksemat migratsioonikiirust vastavalt 0,54 korra võrra 5% CO₂ juuresolekul ja 0,68 korra võrra 20% CO₂ juuresolekul võrreldes NT-ga. Kuna mõlema kasvutingimuse korral oli näha BAY inhibeerivat mõju migratsioonile, viitab see sellele, et tavapärase koekultuuri tingimustes kasutatava 5% CO₂ muutmine 20%-ks ei muuda BxPc-3 rakke vastuvõtlikumaks AHR-i antagonistiks BAY suhtes.

Kui võrreldi 5% ja 20% CO₂ kasvutingimustes inkubeeritud TCDD (10 nM) ja BAY-ga (0,1 µM; 1 µM; 10 µM) töödeldud SU.86.86 rakke selgus, et 5% CO₂ juuresolekul oli kemikaalidega töödeldud rakkude migratsioon samaväärne DMSO-ga töödeldud rakkudega. See viitab sellele, et rakkude migratsiooni muutus on pigem seotud DMSO mõjuga rakkudele. Antud tulemus on kooskõlas Stukas jt (2023) saadud tulemusega, et AHR-i aktiveerimine või inhibeerimine ei mõjuta SU.86.86 rakkude migratsiooni. Eksperimendi tulemustest selgus, et rakud, mida töödeldi BAY-ga (1 µM ja 10 µM) migreerusid 20% CO₂ keskkonnas märgatavalt aeglasemalt võrreldes rakkudega, mida kasvatati 5% CO₂ tingimustes. Saadud andmete põhjal

võib väita, et SU.86.86 rakud olid 20% CO₂ tingimustes BAY (1 μM ja 10 μM) suhtes vastuvõtlikumad, samal ajal kui TCDD-ga töödeldud SU.86.86 rakkude migratsioon nii 5% kui 20% CO₂ tingimustes oli sarnane.

Antud katse näitas, et erinevad rakuliinid reageerivad erinevalt kemikaalide töötlustele erinevates kasvutingimustes. See viitab sellele, et BxPc-3 ja SU.86.86 kasvajakud, olgugi, et mõlemad on PDAC kasvajaliinid, on tõenäoliselt erineva tekkemehhanismiga. Seega tuleb täpne terapeutiline sihtmärk iga kasvaja puhul eraldi kindlaks teha, et rakendada võimalikult täpset ja efektiivset ravi.

Edaspidiseks uurimiseks võiks kasutada teisi PDAC-i rakuliine, kus AHR-i ekspressioon ei ole nii suurelt üles reguleeritud või kasutada rakuliine, milles saab AHR-i ekspressiooni ajutiselt üles reguleerida, et võimalikke AHR-i inhibiitoreid ja aktivaatoreid testida. Sellised rakuliinid võimaldaksid paremini analüüsida agonistide ja antagonistide mõju rakkude migratsioonivõimele.

KOKKUVÖTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida AHR-i agonistide ja antagonistide mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile. Lisaks teada saada, kas AHR-i antagonistide ja agonistide tootlusel on erinev mõju BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsioonile normaal- (5% CO₂) ja hüpoksia (20% CO₂) tingimustes.

Käesoleva töö eksperimentaalse osa tulemustest selgus, et kemikaalitootlus ei mõjuta BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsiooni võimekust koekultuuri kambrites. Agonistid (KYN, TCDD) ja antagonist (BAY) käitusid mõlema rakuliini puhul sarnaselt, mis tähendab, et ei tekkinud kasvajakude migratsiooni erinevusi AHR-i aktivaatorite ja inhibiitori toime vahel. Lisaks selgus *in vitro* kraape-meetodil läbi viidud migratsiooni katsest, et 20% CO₂ kasvutingimused vähendavad migratsiooni nii BxPc-3 kui ka SU.86.86 rakkudel. See viitab sellele, et lisastress mõjutab rakkude migratsiooniaktiivsust. Katsest, kus BxPc-3 rakke töödeldi erinevate BAY kontsentratsioonidega, selgus, et 20%-ne CO₂ ei muuda BxPc-3 rakke BAY suhtes vastuvõtlikumaks. Seevastu TCDD-ga töödeldud BxPc-3 rakud näitasid 20% CO₂ kasvutingimustes suuremat vastuvõtlikkust ning nende migratsioon oli aktiivsem võrreldes töötlemata rakkudega. Kui võrreldi samades kasvutingimustes BAY-ga töödeldud SU.86.86 rakke selgus, et 20% CO₂ puhul olid SU.86.86 rakud BAY 1 µM ning BAY 10 µM suhtes vastuvõtlikumad, mistõttu oli nende migratsiooniaktiivsus ka väiksem. Kemikaalitootlus 0,1 µM kontsentratsiooni BAY-ga oli BxPc-3 rakkudel 5% CO₂ ja SU.86.86 rakkudel nii 5% kui ka 20% CO₂ kasvutingimustes samaväärne DMSO-ga, mis viitab sellele, et rakkude migratsiooni muutus 0,1 µM kontsentratsiooni BAY-ga on pigem seotud DMSO mõjuga rakkudele.

Kokkuvõttes võib öelda, et AHR-i aktiveerimine või inhibeerimine ei mõjutanud BxPc-3 ja SU.86.86 rakkude migratsiooni normaaltingimustel, samas vähendas suurem CO₂ kontsentratsioon kasvukeskkonnas kasvajakude migratsioonivõimet. AHR-i agonistide toime puudumine migratsioonile võis olla põhjustatud sellest, et nende rakkude migratsiooniaktiivsus oli juba maksimaalne ning rakkude töötlemine aktivaatoriga seda enam ei suurendanud. Edasistes katsetes AHR-i inhibiitoritega võiks kasutada PDAC-i rakuliine, milles AHR-i ekspressiooni ei ole algselt nii kõrge, et seda oleks võimalik aktivaatorite ja inhibiitoritega reguleerida.

„Effects of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonist on cell migration in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells”

Egert Vene

SUMMARY

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most occurring types of pancreatic cancer. PDAC is a highly aggressive malignant type of cancer and is the fourth leading cause of cancer-related death worldwide. PDAC has a poor, less than 10% five-year survival rate due to the lack of early diagnosis and limited treatment options. This highlights the urgent need to investigate the cancer development mechanisms to identify new potential therapeutic targets. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor. Previous studies have shown that upregulating or downregulating AHR expression is associated with various oncogenic processes in tumours of different origins. Due to the extensive range of AHR's influence, it holds significant potential as a target for multiple therapeutic drugs.

This bachelor's thesis aimed to investigate the effect of AHR agonists (KYN, TCDD) and an antagonist (BAY) on the migration of BxPc-3 and SU.86.86 cells using the transwell migration assay. Additionally, using an *in vitro* wound healing assay, the study explored whether treatment with the AHR antagonist (BAY) and agonist (TCDD) has differential effects on the migration of BxPc-3 and SU.86.86 cells under 20% CO₂ growth conditions compared to regular 5% CO₂ conditions.

The transwell migration assay demonstrated that different chemical treatments did not affect the migration capacity of BxPc-3 and SU.86.86 cells. The agonists (KYN, TCDD) and the antagonist (BAY) behaved similarly in both cell lines, indicating no differences in tumour cell migration between AHR activators' and inhibitor's actions. However, when comparing 5% and 20% CO₂ growth conditions in BxPc-3 and SU.86.86 cells using wound healing assay, a significant reduction in cell migration was observed under 20% CO₂. However, the AHR antagonist (BAY) and agonist (TCDD) affected the BxPc-3 and SU.86.86 cells differently under various growth conditions, indicating diverse mechanisms in tumour cell development.

KASUTATUD KIRJANDUS

Al-Ghezi, Z. Z., Singh, N., Mehrpouya-Bahrami, P., Busbee, P. B., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P. S. (2019). AhR Activation by TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) Attenuates Pertussis Toxin-Induced Inflammatory Responses by Differential Regulation of Tregs and Th17 Cells Through Specific Targeting by microRNA. *Front Microbiol.* 10, 2349.

Baker J.R., Sakoff J.A. and McCluskey A. (2020). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) as a breast cancer drug target. *Med. Res. Rev.* 40, 972–1001.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 68(6), 394–424.

Caldas, C., Hahn, S., da Costa, L., ... Kern, E. S. (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (*MTS1*) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genetics.* 8, 27–32.

Davarinos, N. A. and Pollenz, R. S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.* 274, 28708–28715.

DiNatale B.C., Smith K., John K., Krishnegowda G., Amin S.G. and Perdew G.H. (2012). Ah receptor antagonism represses head and neck tumor cell aggressive phenotype. *Mol. Cancer Res.* 10, 1369–1379.

Diry, M., Tomkiewicz, C., Koehle, C., Coumoul, X., Bock, K. W., Barouki, R. and Transy, C. (2006). Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene.* 25, 5570–5574.

Dumbrava, E. E., Cecchini, M., Zugazagoitia J., ... Papadopoulos, K. P. (2023). Initial results from a first-in-human, phase I study of immunomodulatory aryl hydrocarbon receptor (AhR) inhibitor BAY2416964 in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 41, 2502-2502.

Elson, D. J. and Kolluri, S. K. (2023). Tumor-Suppressive Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) and AhR as a Therapeutic Target in Cancer. *Biology (Basel).* 12(4), 526.

Gouasmi, R., Ferraro-Peyret, C., Nancey, S., Coste, I., Renno, T., Chaveroux, C., Aznar, N. and Ansieau, S. (2022). The Kynurenine Pathway and Cancer: Why Keep It Simple When You Can Make It Complicated. *Cancers (Basel)*. 14(11), 2793.

Griffith, B. D. and Frankel, T. L. (2024). The Aryl Hydrocarbon Receptor: Impact on the Tumor Immune Microenvironment and Modulation as a Potential Therapy. *Cancers (Basel)*. 16(3), 472.

Hanieh, H., Ismail, B. M., Alfwuaires, A. M., Ibrahim, M. H-I. and Farhan, M. (2023). Aryl Hydrocarbon Receptor as an Anticancer Target: An Overview of Ten Years Odyssey. *Molecules*. 2–4.

Hayashibara T., Yamada Y., Mori N., Harasawa H., Sugahara K., Miyanishi T., Kamihira S. and Tomonaga, M. (2003). Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: Constitutive activation of AhR in ATL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 128–134.

Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y. and Kawajiri, Y. (1998). Nuclear Localization and Export Signals of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *J. Bio. Chem.* 273(5), 2895-2904.

Ishida M., Mikami S., Kikuchi E., Kosaka T., Miyajima A., Nakagawa K., Mukai M., Okada Y. and Oya M. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by upregulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer. *Carcinogenesis*. 31, 287–295.

Jiang, Y. Z., Wang, K., Fang, R. and Zheng, J. (2010). Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 679-685.

Kazlauskas, A., Poellinger, L. and Pongratz, I. (1999). Evidence That the Co-chaperone p23 Regulates Ligand Responsiveness of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 13519-13524.

Kimura, E., Ding, Y. and Tohyama, C. (2016). AhR signaling activation disrupts migration and dendritic growth of olfactory interneurons in the developing mouse. *Sci. Rep.* 6, 26386.

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

- Kou, Z. and Dai, W. (2021). Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. *Biochem. Pharmacol.* 185, 114428.
- Kreuzaler, P., Panina, Y., Segal, J. and Yuneva, M. (2020). Adapt and conquer: Metabolic flexibility in cancer growth, invasion and evasion. *Molecular metabolism*, 33, 83–101.
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J. and Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open.* 7, 1–9.
- Lee, C. C., Yang, W. H., Li, C. H., Cheng, Y. W., Tsai, C. H. and Kang, J. J. (2016). Ligand independent aryl hydrocarbon receptor inhibits lung cancer cell invasion by degradation of Smad4. *Cancer Lett.* 376, 211-217.
- Lepp, A. (2018). Liikumisaparaat, siseelundid, p. 366-367. *In* Lepp, A., Lepp-Kogerman, E., Maimets, O., Rooks, G., Ulp, K. *Inimese anatoomia, I osa. Õpik Kõrgkoolidele*, Tartu Ülikooli Kirjastus OÜ, Tartu.
- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G. and Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 7, 3.
- Liu, Y., Lv, J., Liu, J., ... Huang, B. (2020). Mucus production stimulated by IFN-AhR signaling triggers hypoxia of COVID-19. *Cell Res.* 30, 1078-1087.
- Ma, X., Kundu, N., Rifat, S., Walser, T. and Fulton, A. M. (2006). Prostaglandin E Receptor EP4 Antagonism Inhibits Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 66, 2923-2927.
- Mimura, J. and Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *BBA-Gen. Subjects.* 263-268.
- Mouratidis, P. X. E., Costa, M., Rivens, I., Repasky, E. E. and Haar ter G. (2021). Pulsed focused ultrasound can improve the anti-cancer effects of immune checkpoint inhibitors in murine pancreatic cancer. *J. Roy. Soc. Interface.* 18, 180.
- Murray, I., Patterson, A. and Perdew, G. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer.* 14, 801–814.
- Opitz, A. C., Holfelder, C., Prentzell, M. T. and Trump, S. (2023). The complex biology of aryl hydrocarbon receptor activation in cancer and beyond. *Biochem. Pharmacology.* 216, 115798.

- Peng, T-L., Chen, J., Mao, W., Song, X. and Chen, M-H. (2009). Aryl hydrocarbon receptor pathway activation enhances gastric cancer cell invasiveness likely through a c-Jun-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. *BMC Cell Biol.* 10, 27.
- Phillips, J. L., Löhr, C. V., Nguyen, B. D., Buermeyer, A. B. and Kolluri, S. K. (2022). Loss of the aryl hydrocarbon receptor increases tumorigenesis in p53-deficient mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* 454, 116191.
- Racu, M.-L., Lebrun, L., Schiavo, A. A., ... D'Haene, N. (2022). The Role of *SMAD4* Inactivation in Epithelial–Mesenchymal Plasticity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: The Missing Link? *Cancers (Basel)*. 14(4), 973.
- Roman, A. C., Carvajal-Gonzalez, J. M. and Rico-Leo, E. M. and Fernandez-Salguero, P. M. (2009). Dioxin Receptor Deficiency Impairs Angiogenesis by a Mechanism Involving VEGF-A Depletion in the Endothelium and Transforming Growth Factor- β Overexpression in the Stroma. *J. Biol. Chem.* 284(37), 25135-25148.
- Scarpa, A., Capelli, P., Mukai, K., Zamboni, G., Oda, T., Iacono, C. and Hirohashi, S. (1993). Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am. J. Pathol.* 142(5), 1534-43.
- Sherr D.H. and Monti S. (2013). The role of the aryl hydrocarbon receptor in normal and malignant B cell development. *Semin. Immunopathol.* 35, 705–716.
- Shin, J. H., Moreno-Nieves, U. Y., Zhang, L. H., Chen C., Dixon, A. L., Linde, M. H., Mace, E. M. and Sunwoo, J. B. (2021). AHR Regulates NK Cell Migration via ASB2–Mediated Ubiquitination of Filamin A. *Front. Immunol.* 12, 624284.
- 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.
- Standring, S., Anand, N., Birch, R., ... Wigley, B. C. (2016). Pancreas, p. 1179-1181. *In* Ross, J.-Gray's Anatomy 41st ed., Elsevier, Amsterdam.
- Stevens, E. A., Mezrich, J. D. and Bradfield, C. A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology.* 127, 299-311.

- 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.
- Stoffel, M. E., Randall, E. B. and Goggins, M. (2023). Pancreatic Cancer: Changing Epidemiology and New Approaches to Risk Assessment, Early Detection, and Prevention. *Gastroenterology.* 164, 752-765.
- Stukas, D., Jasukaitiene, A., Bartkeviciene, A., Matthews, J., Maimets, T., Teino, I., Jaudzems, K., Gulbinas, A. and Dambrauskas, Z. (2023). Targeting AHR Increases Pancreatic Cancer Cell Sensitivity to Gemcitabine through the ELAVL1-DCK Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 13155.
- Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R. and Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell systems.* 9(2), 109–127.
- Sumiyoshi, T., Uemura, K., Shintakuya, R., ... Takahashi, S. (2023). Prognostic factor in patient with recurrent pancreatic adenocarcinoma. *Langenbeck. Arch. Surg.* 408, 347.
- Sun, J-S., Zhang, X-L., Yang, Y-J., Nie, Z-G. and Zhang, Y. (2015). Hypoxia promotes C-X-C chemokine receptor type 4 expression through microRNA-150 in pancreatic cancer cells. *Oncol. Lett.* 10, 835-840.
- Swanson, H. I., Chan, W. K., andBradfield, C. A. (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 26292–26302.
- Zimmermann, M-L., Innos, K., Paapsi, K., Härmaorg, P. and Mägi, M. (2023). Vähk Eestis: haigestumus 2020, elulemus 2016–2020 ja hematoloogilised kasvaja 2011–2020. *Tervise Arengu Instituut.* 13-48.
- Wang, S., Zheng, Y., Yang, F., ... Dong, Q.-Z. (2021). The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 6, 249.
- Wang, Z., Snyder, M., Kenison, J. E., ... Sherr, D. H. (2020). How the AHR Became Important in Cancer: The Role of Chronically Active AHR in Cancer Aggression. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 387.
- Wood, D. L., Yurgelun, B. M. and Goggins, G. M. (2019). Genetics of Familial and Sporadic Pancreatic Cancer. *Gastroenterology.* 156, 2041-2055.

Yamaki, T., Endoh, K., Miyahara, M., Nagamine, I., Huong, N. T. T., Sakurai, H., Pokorny, J. and Yano, T. (2004). Prostaglandin E2 activates Src signaling in lung adenocarcinoma cell via EP3. *Cancer Lett.* 214, 115-120.

Yin, J., Sheng, B., Qiu, Y., Yang, K., Xiao, W. and Yang, H. (2016). Role of AhR in positive regulation of cell proliferation and survival. *Cell Proliferat.* 49, 554-560.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. Eesti Vähiliit - <https://cancer.ee/statistika-2/> (kasutatud 29.01.2024)
2. Ensembl -
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000106546;r=7:16916359-17346152;t=ENST00000242057 (kasutatud 01.11.2023)
3. MedicinePlus - <https://medlineplus.gov/anatomy.html> (kasutatud 08.05.2024)
4. Pancreatic Cancer Action - <https://pancreaticcanceraction.org/about-pancreatic-cancer/what-is-pancreatic-cancer/what-is-the-pancreas/> (kasutatud 10.01.2024)
5. Tartu Ülikooli Kliinikum - <https://www.kliinikum.ee/ho/info-haiguste-kohta/2-uncategorised/90-kohunaeaermevaehk> (kasutatud 29.01.2024)
6. UniProt - <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35869/entry> (kasutatud 01.11.2023)
7. UniProt - https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35869/entry#family_and_domains (kasutatud 22.02.2024)
8. World Cancer Research Fund - <https://www.wcrf.org/cancer-trends/pancreatic-cancer-statistics/> (kasutatud 17.05.2024)

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, Egert Vene, annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju inimese pankrease kasvaja rakkude migratsioonile“, mille juhendaja on Kristina Mäemets-Allas.

1. 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'i 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.

Egert Vene

27.05.2024