

TARTU ÜLIKOOL

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

**Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju inimese pankreasejuha
adenokartsinoomi rakkude geeniekspressioonile**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Pauliine Konsa

Juhendajad

PhD Indrek Teino

PhD Antti Matvere

TARTU 2021

„Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju inimese pankreasejuha adenokartsinoomi rakkude geeniekspressioonile“

Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on transkriptsioonifaktor, mis on oluline erinevate keskkonnakemikaalide lagundamisel. Mitmes inimese kasvajas, sealhulgas pankreasejuha adenokartsinoomis (PDAC) on näidatud *AHR*-i üles regulatsiooni.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida *AHR*-i funktsionaalsust inimese PDAC rakkudes. Eksperimentide tulemusena selgus, et *AHR* on ekspresseeritud erinevatel tasemetel PDAC rakuliinides. Lisaks täheldati, et *AHR* on oluline rakkude kasvul ja indutseerib SU.86.86 ja BxPc-3 rakuliinides *COX2*, *PD-L1* ja *IDO1* ekspressiooni. Antud geene on varasemalt seostatud vähirakkude invasiivsuse ja proliferatsiooni suurenemisega ning apoptoosi inhibitsiooni ja immuunsüsteemi vältimisega.

Märksõnad: arüülsüivesinike retseptor, inimese pankreasejuha adenokartsinoom, *IDO1*, *PD-L1*, *COX2*.

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

„Effects of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonists on gene expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells“

Transcription factor aryl hydrocarbon receptor is an important sensor of environmental chemicals. It has also been shown that *AHR* is upregulated in many human cancers such as pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).

The aim of this Bachelor's thesis was to study the functionality of *AHR* in PDAC cell lines. The results showed that *AHR* expression varies between different PDAC lines. It was also noted that *AHR* is important for cell growth and regulates the expression of *COX2*, *PD-L1* and *IDO1* in SU.86.86 and BxPc-3 cells. Aforementioned genes have been shown to increase cancer cell invasion, proliferation, inhibition of apoptosis and aid in evasion of the immune system.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor, human pancreatic ductal adenocarcinoma, *IDO1*, *PD-L1*, *COX2*.

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

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Arüülsüsivesinike retseptor.....	8
1.1.1. Arüülsüsivesinike retseptori struktuur	8
1.1.2. Arüülsüsivesinike retseptori signaalrada.....	9
1.1.3. Arüülsüsivesinike retseptori funktsioon organismis	10
1.1.4. Arüülsüsivesinike retseptori ligandid.....	10
1.1.5. Tsütokroom P450 ensüümide roll metabolismis.....	11
1.2. Pankreas	12
1.2.1. Pankrease anatoomia	12
1.2.3. Inimese pankreasejuha adenokartsinoom.....	13
1.3. Arüülsüsivesinike retseptor ja kasvajakad.....	14
1.3.1. Arüülsüsivesinike retseptori ekspressioon kasvajates.....	14
1.3.2. IDO1/KYN/AHR signaalrada kasvajates	14
1.3.3. Arüülsüsivesinike retseptor ja kasvajarakkude apoptoosi inhibitsioon.....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjal ja metoodika	18
2.2.1. Inimese pankreasevähi rakuliinide kasvatamine	18
2.2.2. Haavakatse	18
2.2.2. RNA eraldamine.....	19
2.2.3. Pöördtranskriptsioon	19
2.2.4. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR).....	19
2.2.5. SDS-PAGE ja <i>Western blot</i> analüüs	20
2.2.6. Klonimine	21
2.2.7. Transformatsioon ja plasmidi puhastamine	22
2.2.8. Andmete statistiline analüüs.....	23
2.3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	24
2.3.1. Inimese pankreasejuha adenokartsinoomi rakuliinide võrdlus.....	24
2.3.1.1. Arüülsüsivesinike retseptori ekspressioon PDAC rakuliinides.....	24
2.3.1.2. Arüülsüsivesinike retseptori klassikaliste sihtmärkgeenide ekspressioon PDAC rakuliinides	25
2.3.1.4. IDO/KYN/AHR signaalraja geenide ekspressioon PDAC rakuliinides	26

2.3.2. Arüülsüivesinike retseptori aktiveerimise ja inhibeerimise mõju PDAC rakuliinidele	28
2.3.2.1. Arüülsüivesinike retseptori aktiivsuse moduleerimise mõju klassikalistele sihtmärkgeenidele.....	28
2.3.2.2. Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju IDO1/KYN/AHR signaalraja geenidele	31
2.3.2.3. Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju PDAC rakuliinide kasvukiirusele.....	35
2.3.3. AHR-spetsiifilise CRISPR-Cas9 plasmidi konstrueerimine	40
KOKKUVÕTE	41
SUMMARY	42
KIRJANDUSE LOETELU.....	44
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	53
LISAD	54
Lisa 1. qPCR-is kasutatud oligonukleotiidid	54
LIHTLITSENTS.....	55

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>)
Ct	lävitsükkel (<i>cycle threshold</i>)
CTL	tsütotoksilised T-lümfotsüüdid (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>)
CYP	tsütokroom P450 valk (<i>cytochrome P450 protein</i>)
EH	epoksiid hürdolaas (<i>epoxid hydrolase</i>)
HAH	halogeenitud aromaadne süivesinik (<i>halogenated aromatic hydrocarbon</i>)
HSP90	kuumašoki valk 90 (<i>heat shock protein 90</i>)
IDO	indoolamiin 2,3-dioksügenaas (<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>)
IL	interleukiin (<i>interleukin</i>)
INF	interferoon (<i>interferon</i>)
ISX	soolestiku spetsiifiline homebox (<i>intestine specific homebox</i>)
KYN	L-künureniin (<i>L-kynurenine</i>)
NES	tuuma ekspordi signaal (<i>nuclear export signal</i>)
NLS	tuuma lokalisatsiooni signaal (<i>nuclear localization signal</i>)
PAH	polütsükkliline aromaadne süivesinik (<i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i>)
PAS	Per-ARNT-Sim (<i>Period/ARNT/Single-Minded</i>)
PD-1	programeeritud raku surma valk 1 (<i>programmed cell death protein 1</i>)
PDAC	pankreasejuha adenokartsinoom (<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>)

PG	prostaglandiin (<i>prostaglandin</i>)
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
SDS-PAGE	naatriumdodetsüülsulfaat – polüakrüülamiid geelelektroforees (<i>sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SLC	solvaadi kandja (<i>solute carrier</i>)
STAT3	signaali transduktor ja transkriptsiooni aktivaator 3 (<i>signal transducer and activator of transcription 3</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>)
TDO	trüptofaani dioksügenaas (<i>tryptophan dioxygenase</i>)
TGF- β	transformeeriv kasvufaktor beeta (<i>transforming growth factor beta</i>)
WT	metsiktüüp (<i>wild-type</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 kõige sagedamini esinev kõhunäärmevähk. Kuna selle varased faasid on enamjaolt asümptomaatilised, diagnoositakse see tihti hilises faasis, mistõttu on kõhunäärmevähki suremus kõrge. On täheldatud, et PDAC allub raskesti tavapärastele vähiravi meetoditele nagu kiiritusravi ning kemoteeraapia. Seetõttu otsitakse üha enam uudseid mooduseid selle kasvaja raviks.

Arüülsüivesinike retseptor (AHR) on ligandaktiveeritav transkriptsioonifaktor, mis on peamiselt tuntud kui keskkonnakemikaalide sensor. AHR vahendab nii kemikaalide toksilist efekti, kui viib nende detoksifikatsioonini. AHR-i aktiveerivateks ühenditeks on näiteks kartsinogeen TCDD ja suitsus leiduvad polütsükliilised aromaatsed süivesinikud. AHR-i ülesregulatsiooni on täheldatud mitmetes kasvajates, seal hulgas ka PDAC-is. AHR-i roll rakus sõltub nii uuritavast koest, spetsiifilisest kasvajatüübist kui ka seda aktiveerivast ligandist. Ühelt poolt on näidatud, et AHR-i aktiivsuse inhibeerimine viib kasvajarakkude migratsiooni ja invasiivsuse vähenemiseni, kuid samas võib selle aktiveerimisel olla kasvajarakkude elulemusele ja kasvule inhibeeriv efekt.

Künureniin (KYN) on AHR-i endogeenne ligand, mille metabolism trüptofaanist toimub IDO1 (indoolamiin 2,3-dioksügenaas 1) vahendusel. Künureniini ja IDO1 kõrget taset seostakse kasvaja raskema haiguskulu ning ravile allumatusega. Samuti on näidatud seost AHR-i aktivatsiooni ja *IDO1* ekspressiooni tõusu vahel. IDO1/KYN/AHR signaalrajaga on seostatud mitmeid valke nagu ISX, STAT3 ja COX2, mis suurendavad kasvajarakkude invasiivsust, proliferatsiooni ja metsastaseerumist. Senini pole PDAC rakkudes IDO1/KYN/AHR raja funktsionaalsust uuritud.

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärk oli uurida AHR-i ekspressiooni ning rolli PDAC rakkudes ja tuvastada, kas PDAC rakuliinides toimib IDO1/KYN/AHR signaalrada. Antud signaalraja geenide ekspressiooni kaardistamine PDAC rakkudes on oluline, et leida uudseid potentsiaalseid sihtmärke vähiraviks.

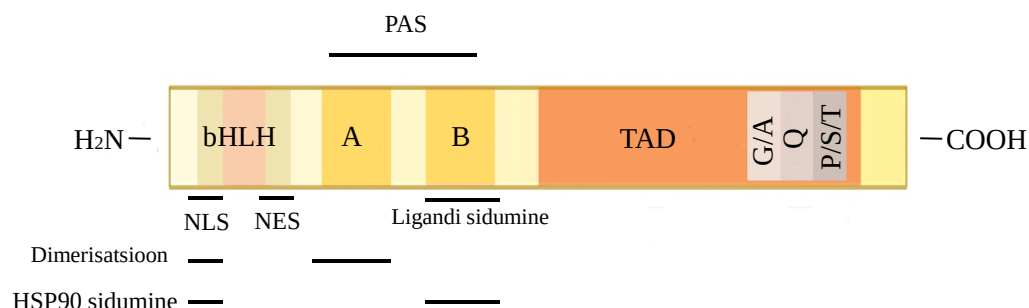
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Arüülsüivesinike retseptor

1.1.1. Arüülsüivesinike retseptori struktuur

Inimese arüülsüivesinike retseptori (*aryl hydrocarbon receptor*, AHR) geen asub 7. kromosoomis ning koosneb 11 eksonist, millelt transkribeeritakse 6243 aluspaari pikkune mRNA (Ensembl). AHR-i valk koosneb 848 aminohappejäägist ning on molekulmassiga 96 kDa (Uniprot). AHR kuulub transkriptsioonifaktorite perekonda, mis koosneb 19 valgust, mille hulgas on lisaks AHR-ile ka AHR-i tuuma translokaator ARNT ja repressor AHRR (NCBI). Neile on omased kolm sarnast domeeni: N-terminaalses osas asuv aluseline heeliks-ling-heeliks (bHLH) motiiv, Per-ARNT-Sim (PAS) domeen ja C-terminaalses osas asuv vähem konserveerunud transaktivatsiooni domeen (TAD). Enamik bHLH/PAS valke on võimelised kas homo- või heterodimeriseeruma ning on aktiivsed dimeerses olekus. (Furness *et al.*, 2007; Larigot *et al.*, 2018)

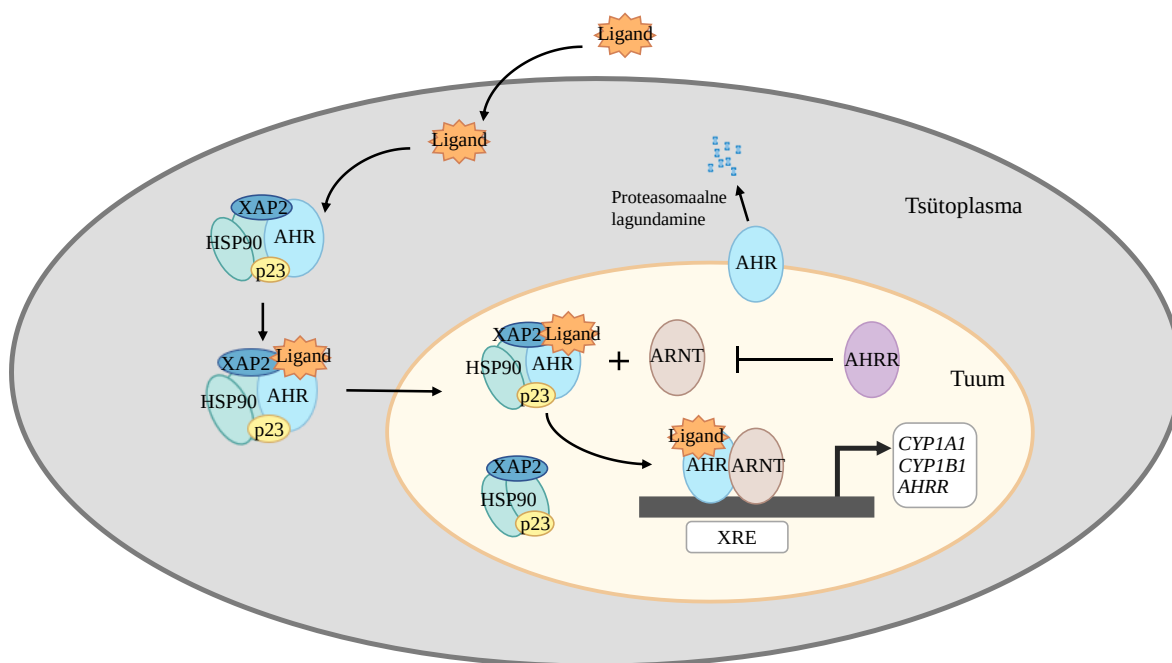
AHR-i bHLH regioonis asuvad tuuma ja tsütoplasmasse transpordiks vajalikud tuuma lokalisatsiooni (NLS) ja ekspordi signaalid (NES) (Joonis 1) (Ikuta *et al.*, 1998). Heeliks-ling-heeliks domeen osaleb inaktiivse AHR-i interaktsioonides tsäperonidega, dimeriseerumisel ARNT-iga ja seondumisel DNA-ga. PAS-domeene on AHR-i valgus kaks – PAS-A ja PAS-B. Esimene osaleb dimeriseerumisel ning teine ligandiga seondumisel ja interaktsioonides tsäperonidega (Monostory *et al.*, 2009). Transaktivatsiooni domeeni kaudu käib interakteerumine koaktivaatorite või repressoritega. C-terminaalses domeenis asuvad kolm aladomeeni: happeliste aminohappejääkide glutamaadi ja asparaadi rohke piirkond (G/A), glutamiinirikas ala (Q) ja regioon, kus esineb palju seriini, treoniini ja proliini (P/S/T) (Larigot *et al.*, 2018).



Joonis 1. Inimese AHR-i struktuur. Kohandatud Monostory *et al.*, (2009) ja Larigot *et al.*, (2018) järgi.

1.1.2. Arüülsüivesinike retseptori signaalrada

AHR on ligandaktiveeritav transkriptsioonifaktor, mis on funktsionaalselt aktiivne, moodustades heterodimeeri transkriptsioonifaktoriga ARNT. Inaktiivne AHR asub raku tsütoplasmas, olles seotud tšaperonide kompleksiga (Joonis 2). 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) ja proteiinkinaas c-SRC. Ligandi seondumisel toimuvad kompleksis konformatsioonilised muutused, mille käigus avaneb tuuma lokalisatsiooni signaal ja toimub kompleksi translokatsioon tuuma, kus vabanevad tšaperonid. Tuumas dimeriseerub AHR ARNT-iga. Funktsionaalselt aktiivne dimeer on võimeline ära tundma genoomis XRE (*xenobiotic response element*) motiivi järjestusega 5'-TNGCGTG-3' (Joonis 2) (Denison *et al.*, 1988). XRE järjestused asuvad AHR-i sihtmärkgeenide regulatoorsetes alades. Dimeeri seondumisel XRE-le toimub geeniekspressiooni indutseerimine või repressioon. Sellele järgneb AHR-i lahkumine XRE järjestuselt ning transport NES järjestuse abil tuumast tsütoplasmasse (Davarinos ja Pollenz, 1999). Tsütoplasmas toimub AHR-i lagundamine proteasoomide poolt (Reisz-Porszasz *et al.*, 1994).



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

Üheks AHR-i märklaudgeeniks on AHRR ehk AHR-i repressor. AHR-ARNT dimeeri seondumisel AHRR-i promootorile indutseeritakse selle ekspressioon (Mimura *et al.*, 1999). AHRR on võimeline seonduma ARNT-iga, mille tagajärjel transporditakse monomeerne AHR tuumast välja ning lagundatakse. Samuti seondub transkriptsiooniliselt mitteaktiivne AHRR-

ARNT dimeer XRE järjestustele, vaigistades seeläbi AHR-i poolt indutseeritud geeniekspressiooni (Sakurai, 2017).

1.1.3. Arüüsüsivesinike retseptori funktsioon organismis

AHR-i ekspressioonitase on organites ja kudedes varieeruv. Inimesel on detekteeritud AHR-i kõrget taset maksa-, neeru- ning kopsurakkudes, samas kui pankrease ja silma rakkudes on AHR nõrgalt ekspresseeritud (Human Protein Atlas). Koespetsiifilisel AHR-i ekspressioonil mängivad olulist rolli tsütokiinid TGF- β (*Transforming growth factor beta*) ja IL-4 (interleukiin 4) (Wolff *et al.*, 2001). Lisaks on seostatud Wnt/ β -kateniini signaalrada AHR-i regulatsiooniga (Chesire *et al.*, 2004). Epigeneetilised mehhanismid, mis osalevad AHR-i geeniekspressiooni regulatsioonis, on AHR-i promootoris olevate CpG-saarte DNA metüleerimine ning histoonide atsetüleerimine (Mulero-Navarro ja Fernandez-Salguero, 2016). Post-transkriptsioonilisel tasemel toimub AHR-i taseme vähendamine näiteks läbi miR-124 (Huang *et al.*, 2011).

Esimesena kirjeldati AHR-i kui ksenobiootikumide metabolismis olulist transkriptsioonifaktorit, mis tõstab metabolismiradades osalevate ensüümide ekspressiooni. Sellised AHR-i sihtmärkgeenid on näiteks tsütokroom P450 perekonda kuuluvad *CYP1A1*, *CYP1A2* ja *CYP1B1*, mis osalevad süsivesinike metabolismis (Mandal, 2005). Hiljem on tõestatud, et AHR osaleb ka endogeensete ainete metabolismiradade signalisatsioonis ning on seotud mitmete teiste organismis toimuvate protsessidega (Hubbard *et al.*, 2015). Peale metabolismi mõjutab AHR rakutsükli, rakkude migratsiooni, adhesiooni, elulemust, diferentseerumist ja vastutab erinevate protsesside eest nii embrüonaalses kui ka täiskasvanueas (Nebert, 2017). Näiteks on inimese embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisel näidatud AHR-i ekspressiooni tugevat repressiooni, mis viitab selle transkriptsioonifaktori olulisusele pluripotentsetes tüvirakkudes (Teino *et al.*, 2020).

1.1.4. Arüüsüsivesinike retseptori ligandid

Tsütoplasmas asetseva inaktiivse AHR-i tuuma transpordiks ja tsäperonidest vabanemiseks on vajalik ligandi seondumine AHR-iga. Esimene kirjeldatud AHR-i ligand oli TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenso-*p*-dioksiin), mis suurendab näiteks *CYP1A1* ja *CYP1B1* (tsütokroom P450 ensüümid) ekspressiooni (Poland *et al.*, 1976). Suur osa kõrge afiinsusega AHR-i ligandidest kuuluvad suitsus leiduvate polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike (PAH) või halogeenitud aromaatsete süsivesinike (HAH) hulka (Denison ja Nagy, 2003). Paljudega neist puututakse igapäevaselt kokku näiteks läbi sõiduvahendite, sealhulgas meretranspordi, heitgaaside aga ka läbi toiduahela. Üldjuhul sisaldavad toored toiduained madalal tasemel PAH-e. Suuremates

kogustes PAH-e leidub aga grillitud ja praetud toidus (Larsen *et al.*, 2002). Muuhulgas on välja toodud Läänemeres elavate kalade saastumist TCDD-ga (Simm *et al.*, 2015). Lisaks on näidatud, et AHR-i sihtmärkgeenid ning füsioloogilised protsessid, milles AHR osaleb, sõltuvad nii AHR-i ligandist kui ka koest, kus aktivatsioon aset leiab (Nault *et al.*, 2013).

Mitmed AHR-i ligandid omavad toksilist mõju. Näiteks TCDD on kartsinogeen, mis põhjustab sünnidefekte ning südame- ja vaskulaarsüsteemi haigusi (Mandal, 2005). On näidatud, et AHR-puudulikel hiirtel ei esinenud TCDD toksilisi mõjusid ehk TCDD tugevat toksilist efekti vahendatakse spetsiifiliselt AHR-i kaudu (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996). Lisaks on olemas ka endogeensed ligandid, mis sünteesitakse rakus või omistatakse toiduga. Endogeensetel AHR-i ligandidel puudub tugev toksiline efekt, sest ekspresseeruvad teised sihtmärkgeenid, toksilisi vaheühendeid ei moodustu ja ligandid metaboliseeritakse kiiresti, takistades niimoodi nende ühendite bioakumuleerumist. AHR-i endogeensete ligandide hulka kuuluvad muuhulgas künureniin (KYN), ITE (2-(1' H-indool-3'-karbonüül)-tiasool-4-karboksüülhappe metüül ester), 6-formüülindolo[3,2-b]karbasool (FICZ) ning indool-3-karbinool (I3C) (Denison ja Nagy, 2003). Brokolis ja lillkapsas leiduva glükobrassiini metaboliseerib mürosinaas I3C-ks, mis on nõrk AHR-i ligand ja millest moodustuvad teised AHR-i aktiveerivad ühendid nagu indolokarbasool (ICZ) ja 3,3'-diindolüülmetaan (DIM) (Bjeldanes *et al.*, 1991). Aminohappe trüptofaani mitmed metaboliidid nagu künureniin, indigo, indirubiin, dopamiin ja serotoniin on AHR-i ligandideks (Park *et al.*, 2020). UV-kiirguse toime moodustub trüptofaanist FICZ, millel on tugev afiinsus AHR-i suhtes (Wincent *et al.*, 2009).

AHR-i antagonistideks loetakse ühendeid, mis takistavad AHR-iga seondudes viimase tuuma liikumist ega vii sihtmärkgeenide ekspressioonini. AHR-i antagonistid on näiteks GNF351, CH223191, resveratrol, BAY 2416964 ning 3,4-dimetoksüflavoon (3,4-DMF) (Nguyen *et al.*, 2015; Lee ja Safe 2000). Arvestades, et mitmete haiguslike seisundite, sealhulgas eri vähivormide puhul on täheldatud kõrget AHR-i ekspressiooni ja aktiivsust, on AHR-i inhibiitorite kasutamine ravimina paljudele huvipakkuvaks valdkonnaks. Lisaks on oluline ära märkida, et AHR-i antagonist BAY 2416964 on kliinilises uuringus kui potentsiaalne suukaudne kasvaja vastane ravim (Clinical Trials).

1.1.5. Tsütokroom P450 ensüümide roll metabolismis

CYP1A1 kuulub tsütokroom P450 ensüümide perekonda (CYP), mis osalevad mitmete toksiliste ainete metabolismis. CYP-id on I ja II faasi ainete metabolismi ensüümid, mis katalüüsivad aromaatsete ühendite hüdroksüülimist ja oksüdeerimist (McDonnell ja Dang 2013). Nende üheks substraadiks on PAH-id nagu benso[a]püreen (BaP), mida seostatakse

suurenenud kopsuvähi tekkimise riskiga. PAH-id on lipofiilsed ja läbivad rakumembraani passiivse difusiooni teel. Tsütoplasmasse jõudes seonduvad nad AHR-iga, mis viib CYP-geenide ekspressiooni tõusuni. Detoksifikatsioonil muudetakse PAH-id CYP-ide osalusel polaarsemateks ja vees lahustuvateks metaboliitideks, mis väljuvad kehast ja millel puudub kartsinogeenne efekt (Shimada, 2006).

PAH-e loetakse prekartsinogeenseteks ühenditeks, mis ise ei oma otseselt kartsinogeenset efekti, vaid mis aktiveeritakse metabolismi käigus ja uued moodustunud molekulid on võimelised tekitama DNA-s mutatsioone. PAH-ide aktivatsioon kartsinogeenseteks ühenditeks võib toimuda läbi CYP1A1/1B ja epoksiidi hüdrolaasi raja (CYP/EH). Üheks CYP/EH raja produktiks on kartsinogeen BPDE (benso[a]püriin diool epoksiid), mis on võimeline põhjustama kopsurakkudes G-T transversioone näiteks p53 tuumorsupressor geenis ja KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) onkogeenis. (Moorthy *et al.*, 2015; Shimada ja Fujii-Kuriyama, 2004; Wang *et al.*, 2017a)

CYP-ensüümidel on ka peroksüdaasne aktiivsus, mis võimaldab katalüüsida BaP oksüdeerumist, mille tulemusel moodustuvad lühikese elueaga reaktiivsed katioonid, mis on võimelised kovalentselt seonduvad DNA-ga ja põhjustama kaheahelalisi katkeid. Radikaalid, mis võivad PAH-ide metabolismi tagajärjel tekkida, on diool-epoksiidid ning reaktiivsed ja redoks-aktiivsed o-kinoonid (Ma, 2001). PAH-ide aktivatsioonil mängib peamist rolli CYP1A1, samas kui detoksifikatsioonil osaleb 1A2 (Moorthy *et al.*, 2015).

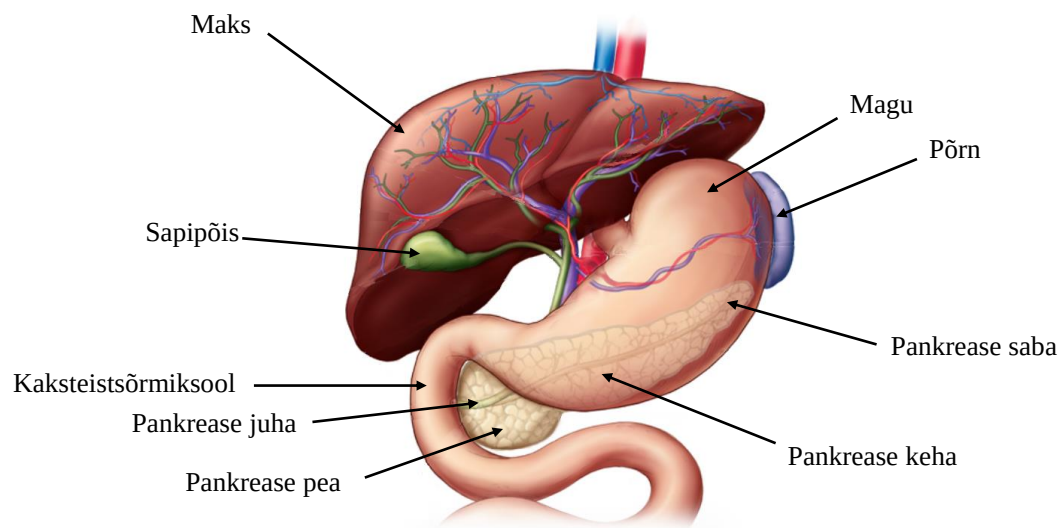
1.2. Pankreas

1.2.1. Pankrease anatoomia

Pankreas ehk kõhunääre on inimese kõhu tagaseinas paiknev organ, millel on nii ekso- kui ka endokriinne funktsioon. Pankreas on umbes 15 cm pikkune, kaalub 70–80 g ning koosneb pankrease peast, keskkohast ehk pankrease kehast ning kitsast sabaosast. Kõhunääre asetseb ristipidi mao taga. Pankrease pea ümber on kaksteistsõrmiksool (*duodenum*) ning pankrease saba ulatub põrnani. Läbi kogu kõhunäärme jookseb pankreasejuha (*ductus pancreaticus*), mis suubub kaksteistsõrmiksoolde (Joonis 3). (Roosalu, 2010)

Kõhunääre sekreteerib seedimiseks olulist kõhunäärmenõret, mis koguneb pankrease juhadesse ning väljub kaksteistsõrmiksoolde, kust liigub edasi makku. Endokriinse funktsiooniga on pankreases asetsevad Langerhansi saared. Need sisaldavad A-, B- ja D-rakke, mis sekreteerivad verre eritatavaid hormoone ja ensüüme. Langerhansi saared moodustavad pankreasest 1–2%. A-rakud toodavad glükagooni, mis on maksas toimuval glükogenolüüsil oluline ensüüm, mis

viib veresuhkru tõusuni. B-rakud toodavad peptiidhormoon insuliini, mis on oluline veresuhkru taseme hoidmiseks ning süsivesinike, lipiidide ja valkude metabolismi regulatsioonis. Glükoosi transpordiks verest rakkudesse on vajalik, et insuliin seonduks insuliini retseptorile. Insuliini seondumine käivitab signaalraja, mille tulemusel toimub glükoosi transporteri translokatsioon tsütoplasmast rakumembraanile, mis võimaldab transportida glükoosi rakku (Wilcox, 2005). Insuliin suurendab glükoosi imendumist verest rakkudesse, vähendab veresuhkru taset ja on seega vastupidise toimega glükagoonile. D-rakud toodavad hormooni somatostatiin, mille roll on reguleerida kasvuhormooni, insuliini ja glükagooni tootmist. (Kingisepp, 2000).



Joonis 3. Inimese pankreas ja seda ümbritsevad organid. Joonis on koostatud Johns Hopkins Medicine põhjal.

1.2.3. Inimese pankreasejuha adenokartsinoom

Pankreasejuha adenokartsinoom (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) on kõige sagedamini esinev ja kõrge suremusega pankreasevähi vorm (Siegel *et al.*, 2020). 90% pankreasevähi juhtudest on tegu PDAC-iga (Adamska *et al.*, 2017) ning 2020. aasta uuringu kohaselt on kõhunäärmevähk maailmas suremuselt seitsmendal kohal, põhjustades aastas 466 003 inimese surma (Sung *et al.*, 2021). Kõhunäärmevähi suurt suremust põhjustavad asjaolud, et kasvaja on varastes staadiumites tihti asümptomaatiline ning ravile resistentne (Vareedayah *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2014; Sarantis *et al.*, 2020). 2017. aasta andmetel moodustas kõhunäärmevähk Eestis 3% kõigist vähijuhtudest nii meestel kui ka naistel (Eesti Vähiliit).

Levinuimad mutatsioonid PDAC-i puhul on KRAS ning HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) onkogeenides ning tuumorsupressorite p16, p53, SMAD4 (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) funktsiooni kadumine (Deer *et al.*, 2010; Hruban *et al.*, 2000).

KRAS onkogeeni mutatsioon on kasvaja puhul üks kõige levinumaid, kusjuures PDAC kasvaja hinnatakse seda esinevat 70–90% juhtudest. Mutatsiooni tulemusel on KRas valk pidevalt aktiveeritud ja toimub signaalradade aktivatsioon ning transkriptsioonifaktorite ekspresseerumine, mis suurendavad rakkude proliferatsiooni, invasiivsust ja transformatsiooni sagedust. (Bournet *et al.*, 2016). SMAD4 on TGF- β signaalraja tuumorsupressor valk, mis on tihti PDAC kasvaja puhul inaktiveeritud. SMAD4 aktiveeritakse TGF- β ligandide toimel ning see põhjustab raku kasvu aeglustumist ja apoptoosi. Inaktiivsel SMAD4 puudub kasvaja supresseeriv toime (Tascilar *et al.*, 2001). Tuumorsupressorit p53 aktiveerib tugev genotoksiline stress, mis viib rakutsükli peatumise ja apoptoosini. 75% juhtudest on pankreasevähis p53 muteerunud (Jahedi *et al.*, 2019).

1.3. Arüülsüivesinike retseptor ja kasvaja

1.3.1. Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon kasvajas

Mitmete inimese kasvaja, näiteks glioblastoomi, rinnavähi, T-rakulise leukeemia, pankreasevähi ning pea- ja kaelakartsinoomi puhul on täheldatud suurenenud AHR-i ekspressiooni (DiNatale *et al.*, 2011; Hayashibara *et al.*, 2003; Koliopanos *et al.*, 2002; Novikov *et al.*, 2016; Opitz *et al.*, 2011). Konstitutiivne Ahr-i aktiivsus hiirtes põhjustab maos kasvaja formeerumist ning viib hiirte eluea lühenemiseni (Andersson *et al.*, 2002; Moennikes *et al.*, 2004). Uuringutes on näidatud, et AHR-i inhibeerimine kasvajarakkudes viib migratsiooni, invasiiooni ja metastaseerumise vähenemiseni (Safe *et al.*, 2013). Samas on ka uurimusi, kus hoopiski AHR-i aktiveerimine erinevate ligandidega nagu Tranilast ja Omeprazole viib kasvajarakkude invasiivsuse vähenemiseni (Jin *et al.*, 2015). Näiteks AHR-i aktiveerimine Raloxifeeniga viib rinnavähi rakud apoptoosi (O'donnell *et al.*, 2014). AHR-i aktiveerimine Carbidopaga, põhjustab kasvajarakkude proliferatsiooni vähenemist (Ogura *et al.*, 2017), mis vastandub Opitz *et al.*, (2011) saadud tulemustele. Sellised tulemused näitavad, et AHR-i mõju kasvaja on nii koe- kui ligandspetsiifiline ning potentsiaalseid kasvajakasvatuseid ravimeid võib otsida nii AHR-i antagonistide kui ka agonistide hulgast.

1.3.2. IDO1/KYN/AHR signaalrada kasvajas

Künureniin on AHR-i endogeenne ligand ja aminohappe trüptofaan kataboliit (DiNatale *et al.*, 2010a). Künureniini kõrget taset seostatakse kasvaja kiirema arenguga ja raskema haiguskuluga (Sordillo *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020). Künureniini metabolism L-trüptofaanist L-künureniiniks toimub IDO1 (indoolamiin 2,3-dioksügenaas 1), IDO2 ja TDO2 (trüptofaani dioksügenaas 2) vahendusel (Baren ja Eynde, 2016; Opitz *et al.*, 2011). IDO1/2 ja TDO2 on

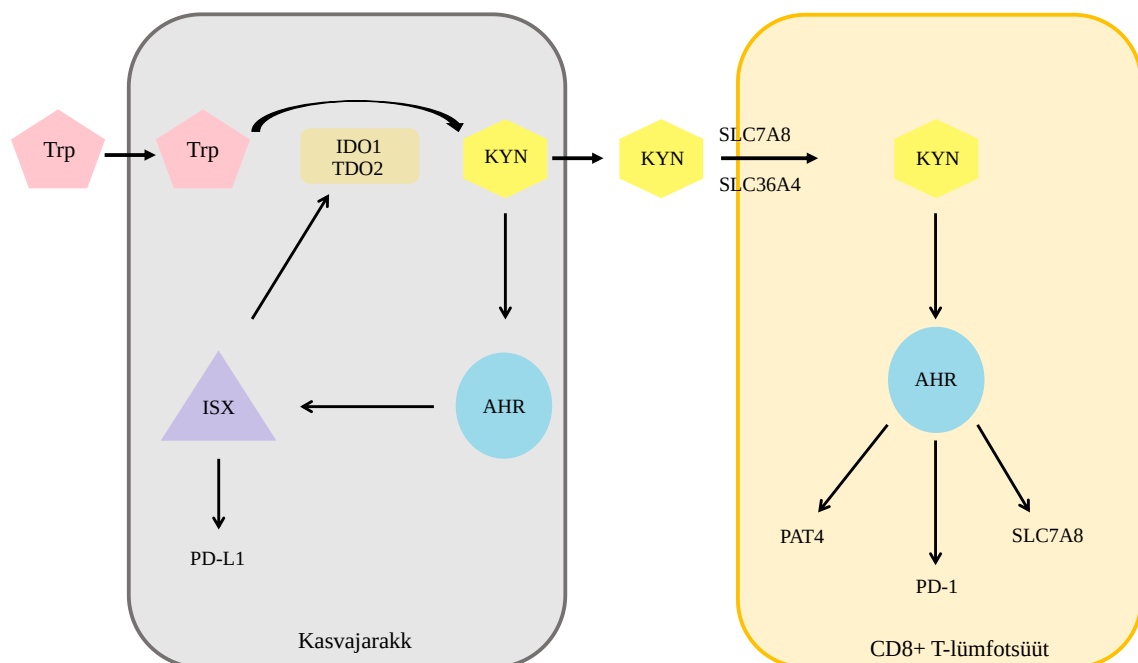
ekspressioonid eri tasemetel eri kudedes ning nende ekspressiooni tõusu on täheldatud mitmetes kasvajates (Godin-Ethier *et al.*, 2011). Trüptofaanist metaboliseeritud künureniin on võimeline rakus AHR-i aktiveerima. Lisaks transpordivad kasvajarakud KYN-i rakust välja, mis liigub KYN-transporterite SLC7A8 ja SLC36A4 abil teistesse immuunsüsteemi või kasvajarakkudesse (Liu *et al.*, 2018b).

Kasvajates hoitakse IDO1 taset kõrgena positiivse tagasisideringi kaudu, kus IDO1 metaboliseeritud künureniin aktiveerib AHR-i ning see omakorda viib *IDO1* ekspressiooni tõusuni. Erinevates kasvajates võib vahelüli, mis seob AHR-i ja *IDO1* ekspressiooni, varieeruda. Kopsuvähi puhul leiti, et AHR indutseerib *IL-6* ekspressiooni (DiNatale *et al.*, 2010b), mis viib transkriptsioonifaktor STAT3 (Signaali transduktor ja transkriptsiooni aktivaator 3) aktivatsioonini, millele järgneb *IDO1* ekspressiooni tõus (Litzenburger *et al.*, 2014). Glioblastoomi rakkudes hoiab *IDO1* ekspressiooni kõrgena STAT3 asemel COX2 (tsüklooksügenaas 2) poolt toodetud PGE2 (prostaglandiin E2) (Hennequart *et al.*, 2017). Positiivset AHR-i ja TDO2 tagasisideringi on täheldatud ka rinnavähirakkudes (Novikov *et al.*, 2016). Maksavähis osaleb IDO1/KYN/AHR rajas transkriptsioonifaktor ISX (*Intestine Specific Homebox*), mille ekspressiooni kasvajarakkudes suurendavad AHR ja IL-6. ISX mõjutab mitmeid kasvaja jaoks olulisi geene nagu *PD-L1* (programmeeritud surma ligand 1) ja *CD86* (diferentseerumise klaster 86). ISX suurendab *IDO1* ja *TDO2* ekspressiooni, mis põhjustab KYN-i hulga suurenemise ja AHR-i aktiveerumise, viies ISX-i enda ekspressiooni tõusuni (Joonis 4) (Wang *et al.*, 2017b). IDO1/KYN/AHR rada omab mitmeid potentsiaalseid vähiravi sihtmärke. Kliinilisi katseid on tehtud IDO1 inhibiitoritega, millega pole aga siiani märkimisväärset edu saavutatud (Opitz *et al.*, 2020).

Keha immuunvastuses kasvajale osalevad tsütotoksilised T-lümfotsüüdid (CTL), mis tunnevad TCR-i (T-lümfotsüüdi retseptor) ja CD8⁺ (diferentseerumise klaster 8) retseptoritega ära muutunud MHC I (peamine koesobivuskompleks I) peptiidesitlemisega rakke ja lüüsisid neid. Muutunud MHC I peptiidesitlemine on omane rakusiseste viiruste ning vähirakkude korral (Peterson *et al.*, 2015). Kasvajad kasutavad CTL-rakkude vältimiseks PD-L1 ligandi ja selle retseptorit PD-1 (programmeeritud surma valk 1). Kasvajasse infiltreeruvad CD8⁺ T-rakud sekreteerivad tsütokiini INF- γ . See põhjustab kasvajarakkudes *IDO1* ekspressiooni tõusu, mille abil metaboliseeritakse trüptofaan künureniiniks ning väljutatakse rakust. Sekreteeritud künureniin siseneb SLC36A4 ja SLC7A8 transporterite abil CD8⁺ rakkudesse, kus aktiveeritakse AHR, mis omakorda viib T-lümfotsüütides *PD-1* ekspressiooni tõusuni. PD-1 seondumisel PD-L1-ga ei lüüsi CD8⁺ T-rakud muutunud MHC I peptiidesitlemisega kasvajarakke ehk toimub immuunsüsteemi vältimine. Tänapäeval on PD-1 ja PD-L1

inhibiitorid kasutusel kasvajate ravis, kuigi nende efektiivsus on varieeruv. Lisaks on uuringud näidanud, et AHR-i aktivatsioon künureeniini poolt viib CD8⁺ T-lümfotsüütides künureeniini transporterite *SLC36A4* ja *SLC7A8* ekspressiooni suurenemiseni. Vaigistades KYN-transporterite ekspressiooni, blokeeritakse künureeniini sissepääs CD8⁺ rakku ja AHR-i aktivatsioon, mis viib PD-1 retseptorite hulga languseni. Künureeniini poolt aktiveeritud AHR seondub CTL rakkudes nii *PD-1*, *SLC36A4* kui ka *SLC7A8* promootorile ja indutseerib nende transkriptsiooni. (Liu *et al.*, 2018b; Smyth *et al.*, 2016)

Pankreasevähi puhul pole uuritud potentsiaalset IDO1/KYN/AHR signaalrada, kuid on näidatud, et suurenenud AHR-i aktiveerimine soodustab kasvaja arengut ning tsütokiinide IL1b, IL6 ja IL8 sekreteerimist, mis võimaldavad kasvajal immuunsüsteemi vältida ja suurendavad selle ja suurendavad selle resistentsust ravile (Wang *et al.*, 2020).



Joonis 4. Trp/IDO1/Kyn/AHR positiivne tagasisidering inimese kasvajakarakkudes ja mõju immuunsüsteemi CTL rakkudele. Koostatud Liu *et al.*, (2018b); Wang *et al.*, (2017b) põhjal.

1.3.3. Arüülsüivesinike retseptor ja kasvajakarakkude apoptoosi inhibitsioon

Mitmete kasvajate nagu rinna- ja maksavähi puhul on välja toodud TCDD/AHR-i kaudu käivat apoptoosi inhibitsiooni (Chopra *et al.*, 2009). Üks valk, mis osaleb läbi AHR-i käiva kasvajakarakkude apoptoosi vältimises on COX2 (Bekki *et al.*, 2015). COX2 on tervetes kudedes madalalt ekspresseeritud arahhidoonhappe metabolismi ensüüm. Kuid COX2 ekspressiooni tõusu on täheldatud nii põletikuliste protsesside mõjul kui ka kasvajakarakkudes. COX2 katalüüsib arahhidoonhappe metabolismi prostaglandiiniks. Sünteesi produktiks on bioaktiivsed prostaglandiinid nagu PGD2 (Prostaglandiin D2) ning PGE2. Kasvajakarakkudes inhibeerib

COX2 rakkude apoptoosi, suurendab invasiivsust ja angiogeneesi ning seda peamiselt läbi PGE2 (Sobolewski *et al.*, 2010). Söögitoru kartsinoomi ja rinnavähi rakkudes on AHR võimeline seonduma COX2 promootorile ja suurendama selle ekspressiooni (Zhu *et al.*, 2020; Vogel *et al.*, 2007; Degner *et al.*, 2009). Lisaks on mitmed arahhidoonhappe metaboliidid nagu PGG2 (Prostaglandiin G2) AHR-i aktivaatorid (Seidel *et al.*, 2001). COX2 ja PGE2 kaudu võib toimuda ka AHR-sõltuv *IDO1/TDO2* ekspressiooni suurenemine ning *PD-L1* ekspressiooni üles reguleerimine (Hennequart *et al.*, 2017; Markosyan *et al.*, 2013). Zhu *et al.*, (2020) näitasid, et kasvaja apoptoosi vältimisel moodustub COX2/PGE2/STAT3 rada, mille aktivatsioon käib AHR-i kaudu. Varasemalt on näidatud, et pankreasevähis on COX2 ekspresseeritud väga erinevatel tasemetel (Eibl *et al.*, 2003; Nørregaard *et al.*, 2015).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud bakalaureusetöö eesmärgid olid:

1. Võrrelda AHR-i ekspressiooni inimese pankreasevähi rakuliinides.
2. Määrata IDO1/KYN/AHR signaalraja geenide *PD-L1*, *PD-1*, *ISX*, *IDO1*, *TDO2*, *SLC7A8*, *SLC36A4*, *COX2* ekspressioon PDAC rakuliinides.
3. Uruida AHR-i agonistide ja antagonistide mõju signaalraja geenide ekspressioonile PDAC rakuliinides.
4. Vaadelda AHR-i agonistide ja antagonistide mõju PDAC rakkude kasvukiirusele.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Inimese pankreasevähi rakuliinide kasvatamine

Töös kasutati inimese PDAC rakuliine SU.86.86, BxPc-3, MIA PaCa-2 PANC-1, mis saadi koostööpartneritelt Leedu Terviseteaduste Ülikoolist. Rakke kasvatati RPMI 1640 söötmes (Corning Inc.), 10% FBS-i (Capricorn Scientific) ja 1% penitsiliini-steptomütsiiniga (Corning Inc.) 100 mm ja 6-kannulistel plaatidel (Greiner Bio-One). Plaatide hoiti inkubaatoris küllastunud veeauru, 37 °C ja 5% CO₂ juures. Söödet vahetati vastavalt rakuliini kasvukiirusele 2-3 päeva tagant ning passeeriti trüpsiiniga (Corning Inc.) 3-6 päeva tagant.

Katsete tegemisel kasutati AHR-i agoniste TCDD (Cambridge Isotope Laboratories) ja L-küüreniini (MedChemExpress LLC) ning AHR-i antagonistide GNF351 (MedChemExpress LLC), CH223191 (MedChemExpress LLC) ja BAY24164 (MedChemExpress LLC).

2.2.2. Haavakatse

PDAC rakuliinide kasvukiiruse muutuse hindamiseks sooritati haavakatse. 48 h enne kemikaalide lisamist passeeriti rakud 6-kannulisele plaadile (8×10^5 rakku/kann). Kahe päeva möödudes, kui rakud oli saavutanud konfluentsuse, tõmmati 200 µl pipetiotsikuga kannu keskele haav ning lisati kemikaalidega sööde. Negatiivse kontrollina lisati rakkudele puhas või DMSO-ga (Sigma-Aldrich) RPMI 1640 sööde. Haava kinnikasvamise jälgimiseks tehti haavast pildid iga 24 h järel. Piltide tegemiseks kasutati Eclipse T100 (Nikon®) mikroskoopi ning 100 x suurendust. Katsed viidi läbi kolmes korduses ning piltide analüüsiks kasutati ImageJ (versioon 1.8.0_172) programmi. Kemikaale hoiti rakkudel 48 h ning pärast seda lüüsi rakud geeniekspressiooni analüüsiks.

2.2.2. RNA eraldamine

Rakkude lüüsiks pesti rakke PBS-iga ja lisati FARB lüüsilahus (Favorgen Biotech Corporation), mis sisaldas 1:100 β -merkaptotoetanooli (Alpha Medthrift Scientific Co.). Lüüsuivad rakud kraabiti mehaaniliselt kokku, tõsteti mikrotuubidesse ning jätkati kohe RNA puhastamisega või säilitati -80 °C juures. RNA puhastamine viidi läbi *Tissue Total RNA Purification Mini* komplektiga (Favorgen Biotech Corporation) tootjapoolset protokollit järgides. RNA elueeriti nukleasivabas vees lõppmahuga 30 μ l. RNA kontsentratsioon ning kvaliteet määrati spektrofotomeetriga NanoDrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific).

2.2.3. Pöördtranskriptsioon

Pöördtranskriptsioon viidi läbi, kasutades RevertAid RT komplekti (Thermo Fisher Scientific). Esmalt teostati DNAasi töötlus lõppmahus 10 μ l, mis sisaldas 1000 ng RNA-d, 1 x reaktsioonipuhvrit, 1 RÜ (Rahvusvaheline ühik) DNAasi ja 10 RÜ RiboLocki. Proove inkubeeriti 30 min 37 °C juures. Seejärel lisati DNAasi inaktiveerimiseks 4,5 mM EDTA-d ning hoiti proove 10 minutit 65 °C juures. Pöördtranskriptsiooni läbi viimiseks segati kokku reaktsioon lõppmahuga 20 μ l, mis sisaldas 1 x reaktsioonipuhvrit, 20 RÜ RiboLocki, 1 mM dNTP-d, 5 μ M *Random Hexamer* praimerit ning 200 RÜ revertaasi. Pöördtranskriptsioon viidi läbi 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) masinas. Pöördtranskriptsiooni programm on toodud Tabelis 1.

Tabel 1. Pöördtranskriptsiooni programm

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

2.2.4. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)

Geeniekspressiooni analüüsiks teostati kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsiooni, mis viidi läbi 384-kannulisel plaadil (Bioplastics), kasutades LightCycler® 480 II (Roche) masinat. Reaktsiooni lõppmaht oli 10 μ l, mis sisaldas 500 nM *forward* praimerit, 500nM *reverse* praimerit, 5 μ l SYBR™ Green/ROX qPCR Master Mix-i (Thermo Fisher Scientific) ja 4 μ l cDNA-d. Negatiivse kontrollina kasutati cDNA asemel vett. Reaktsioonid sooritati triplikaatidena, mille keskmised väärtuseid kasutati analüüsil. Lävitsükliite (*cycle threshold*, Ct) väärtused arvutati LightCycler 480 II programmi abil. Väärtused normaliseeriti koduhoidjageeni *TBP* (*TATA-binding protein*) suhtes. Reaktsiooni käigus tekkinud produktide

õigsuse kontrolliks kasutati sulamiskõvera analüüsi. Kasutatud programm on toodud Tabelis 2 ning praimerid Lisas 1. Relatiivse geeniekspressiooni tulemuste arvutamiseks kasutati Livaki meetodit (Livak ja Scmittgen, 2001).

Tabel 2. qPCR programm

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

2.2.5. SDS-PAGE ja Western blot analüüs

Rakkude lüüsiks kraabiti rakud tassi põhjast PBS-is kokku ning tsentrifuugiti 5 min 300 rcf-i juures toatemperatuuril. Rakud resuspendeeriti lüüsimiseks 50 µl RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*) puhvis (50 mM Tris pH 7,4, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% SDS), kuhu oli lisatud 1 x proteaasi inhibiitor (Roche). Rakud asetati 1 h jääle ning suspendeeriti iga 15 min järel. Lüsates tsentrifuugiti 10 min 4 °C ja 18000 rcf-i juures ning supernatant säilitati -80 °C kapis. Valgu hulga määramiseks kasutati Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific) valgu kontsentratsiooni mõõtmise komplekti ning Multiskan Ascent aparati (Thermo Fischer Scientific).

20 µg-ile valguproovile lisati 1x laadimispuhver, 100 mM ditiotreitol, RIPA puhver kuni 25 µl-ni ning kuumutati 5 min 95 °C juures. 25 µl proove kanti 10% SDS-polüakrüülamiid-geelelektroforeesile ning valgud lahutati Mini-PROTEAN® Tetra Cell masinaga (Bio-Rad) 45 minutit 50 V ja 1 h 170 V juures. Seejärel hoiti metanoolis aktiveeritud polüvinülideen difluoriid (PVDF) membraani ja geeli 5 minutit ülekandepuhvis (192 mM glütsiin, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 10% metanool) millele järgnes valkude ülekanne geelilt PVDF membraanile, kasutades Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad) masinat. Ülekanne toimus 15 min 17 voldiga. Membraani loputati TBST puhvis (Tris-puhver, Tween), misjärel blokeeriti mittespetsiifiline signaal 5% lõssipulbrit sisaldavas TBST-s ühe tunni vältel. Seejärel hoiti membraani üleöö primaarsete antikehadega blokeerimispuhvis. Sellele järgnes 4 x 6 min membraani pesemine TBST lahuses ning 1 h inkubatsiooni sekundaarse antikehaga. Pärast inkubeerimist korrati 4 x 6 min pesu ning kanti membraanile 5 minutiks Immobilon Western

Chemiluminescent HRP substraatide segu (Merck Millipore). Valkude visualiseerimiseks kasutati CemiDoc XRS+ süsteemi (BioRad).

Kasutatud primaarsed antikehad:

- 1) AHR-i vastane hiire polükloonaalne antikeha A3, sc-133088-X, 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology)
- 2) Aktiini vastane küüliku polükloonaalne antikeha, sc-1616-R, 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology)

Kasutatud sekundaarsed antikehad:

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

2.2.6. Kloneerimine

AHR nokaut (AHR-KO) rakuliini tegemiseks kasutati CRISPR-Cas9 meetodikat. Veebikeskkonnas CHOPCHOP disainiti gRNA järjestused 5'-CACCGGTCACCTACGCCAGTCGCAAGCGG-3' ning 5'-AAACCCGCTTGCGACTGGCGTAGGTGACC-3'. Vektorina kasutati plasmidi PX458 (Addgene), mis on 9288 aluspaari pikkune ning sisaldab muuhulgas ampitsilliini resistentsusgeeni, *Cas9* ja *EGFP* geeni ning ühte BbsI ja kahte NotI lõikekohta. Esimese sammuna kloneeriti disainitud AHR-i gRNA järjestus PX458 plasmidi. Selleks viidi läbi restriktiooni reaktsioon plasmid PX458-ga, kasutades restriктаasi BbsI (Thermo Fisher Scientific). Restriktioonisegu lõppmahus 40 µl, sisaldas 1500 ng plasmidi PX458, 10 RÜ restriктаasi BbsI (Thermo Fisher Scientific) ja 1 x reaktsioonipuhvrit. Restriktioon toimus 12 h 37 °C juures. Restriktiooni efektiivsuse kontrolliks tehti geelelektroforees. Kasutati 1% agarosgeeli, millele oli eelnevalt lisatud 1 µg/ml EtBr ning kasutati 1 x TAE puhvrit. Geelile kantud proovi lõppmaht oli 18 µl, mis sisaldas 15 µl restrikteeritud plasmidi ja 1 x DNA laadimispuhvrit (Thermo Fisher Scientific). Restrikteeritud DNA suuruse hindamiseks kasutati 1000 alupaarilist DNA markerit (Thermo Fisher Scientific). Elektroforees viidi läbi 80 V juures 2 h jooksul. Restrikteeritud plasmidi eraldamiseks lõigati UV valguse all välja 10 000 aluspaari suurune DNA vööt. Plasmidi puhastus viidi läbi, kasutades FavorPrep GEL/PCR Purification

komplekti (Favorgen). DNA elueeriti 50 µl-s elueerimispuhvril. DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetri NanoDrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific) abil.

Järgmisena viidi läbi gRNA-spetsiifiliste oligonukleotiidide kokkusuldamine. Oligonukleotiidide kokkusuldamise reaktsiooni lõppmaht oli 20 µl, mis sisaldas 12,5 µM oligonukleotiidi ja 12,5 µM sellega komplementaarset järjestust ning 1 x reaktsioonipuhvrit (10 mM Tris pH 8,0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM). Kokkusuldamine viidi läbi qPCR masinas LightCycler® 480 II (Roche). Oligonukleotiidide denaturatsioon toimus 95 °C 10 min, millele järgnes temperatuuri langetamine kuni 25 °C-ni 1 °C minutis. Oligonukleotiidide lahjendamiseks lisati nukleaasivaba vett, lõppmahuni 1 ml.

Oligonukleotiidide sisetamiseks restrikteeritud plasmidi viidi läbi ligeerimisreaktsioon. Reaktsioonisegu lõppmaht oli 10 µl, mis sisaldas 25 nM oligonukleotiidi, 100 ng restrikteeritud plasmidi, 1 x ligeerimispuhvrit ning 0,5 RÜ T4 DNA ligaasi (Thermo Fisher Scientific). Negatiivse kontrollina lisati oligonukleotiidide asemel reaktsioonisegusse samas mahus vett. Ligeerimine viidi läbi 12 h 16 °C juures.

2.2.7. Transformatsioon ja plasmidi puhastamine

Plasmidi paljundamiseks viidi läbi transformatsioon kuumašoki meetodil. Transformatsioonil lisati *Escherichia coli* DH5α kompetentidele 1 ng Tris puhvris (1 M pH 8,0) lahjendatud plasmidi. Plasmidi ja kompetentide segu hoiti 30 min jääl, 3 min 37 °C juures ja 1 min jääl. Bakteritele lisati 1 ml LB söödet ning kasvatati 1 h ThermoMixeris 37 °C ja 750 rpm-i juures, et avalduks ampitsilliini resistentsusgeen. Rakke fuugiti 3 min 6000 rcf-i juures toatemperatuuril, resuspendeeriti 50 µl LB söötmes ning külvati selektsiooniks ampitsilliini sisaldavale LB tassile. Baktereid kasvatati 16 h 37 °C juures. Seejärel inokuleeriti kolooniad 4 ml-isse LB vedelsöötmesse, mis sisaldas 100 ng/ml ampitsilliini. Kultuuri kasvatati loksutil 16 h 37 °C ja 180 rpm-i juures. Plasmidi puhastamiseks kasutati FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini komplekti (Favorgen).

Plasmiidide korrektsust kontrolliti NotI restriksiooni ja TŮMRI-i tuumiklaboris Sangeri sekveneerimise teel. NotI restriksioonisegu tehti lõppmahus 10 µl. Restriksioonisegu sisaldas 1 µg DNA-d, 10 RÜ NotI restriктаasi (Thermo Fisher Scientific) ja 1x Buffer O-d (Thermo Fisher Scientific). Restriksioon toimus 16 h 37 °C juures. Seejärel lisati proovidele lisati 1 x laadimispuhvrit ning sooritati geelelektroforees 1% agarosigeelil 1,5 h 100 V juures. DNA visualiseeriti BioSpectrum 510 Imaging süsteemiga (UVP).

Suurema koguse plasmidi saamiseks inokuleeriti transformeeritud kompetendi koloonia 50 ml-sse LB söötmesse, mis sisaldas 100 µg/ml ampitsilliini. Kultuuri inkubeeriti üleöö 37 °C loksutis 180 rpm-i juures. Järgnevalt eraldati plasmidne DNA Nucleobond Xtra Midi komplekti (Macherey-Nagel) kasutades vastavalt tootjapoolsele protokollile. DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga Nanodrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific). Saadud plasmidi korrektsust kontrolliti NotI restriksiooni ja Sangeri sekveneerimise teel.

2.2.8. Andmete statistiline analüüs

Käesolevas bakalaureusetöös sooritati eksperimendid kolmes korduses. Haavakatse ja qPCR-i tulemuste esitlemisel kasutati tulemuste keskväärtuseid ning veapiirid tähistavad standardhälbe väärtuseid. Statistilise olulisuse määramiseks kasutati MS Exceli kahepoolset sõltumatut Student-i t-testi, statistilise olulisuse nivooks loeti $p < 0,05$. Tulpdiagrammid on koostatud MS Exceli-is (versioon 16.0.13929.20206). Haavakatse tulemuste analüüsiks ja densitomeetria läbiviimiseks kasutati ImageJ programmi (versioon 1.8.0_172).

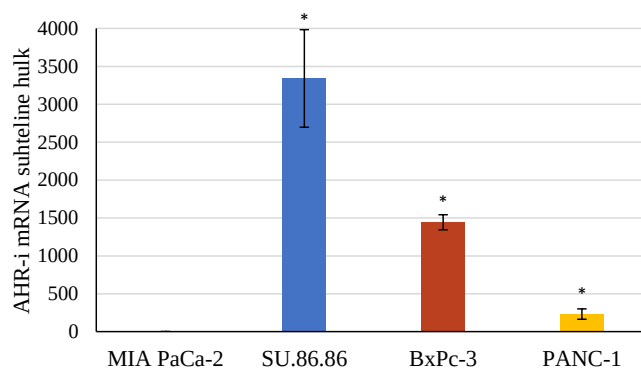
2.3. TULEMUSED JA ARUTELU

2.3.1. Inimese pankreasejuha adenokartsinoomi rakuliinide võrdlus

2.3.1.1. Arüülsüivesinike retseptori ekspressioon PDAC rakuliinides

Käesoleva bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli uurida AHR-i rolli pankreasejuha adenokartsinoomi rakuliinides. Varasemalt on teada, et terves pankrease koes on *AHR* ekspresseeritud vähesel määral (Human Protein Atlas). Seevastu mitmes kõhunäärmevähi rakuliinis on täheldatud *AHR*-i ekspressiooni tõusu ning seda väga erinevatel tasemetel (Jin *et al.*, 2015; Koliopanos *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2017). Koliopanos *et al.*, (2002) uuringus leiti, et *AHR*-i mRNA tase on kõrge liinides AsPC-1, Capan-1, keskmine T3M4 ning madal PANC-1 ja MIA PaCa-2 rakkudes.

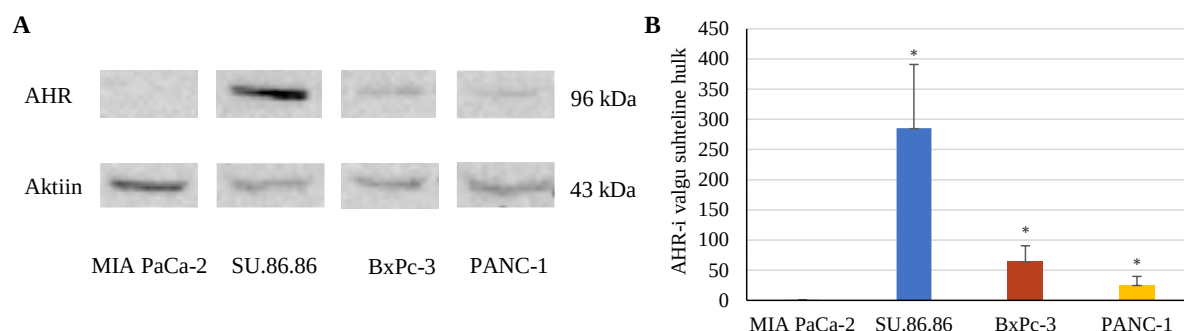
Antud bakalaureusetöös vaadeldi PDAC rakuliine PANC-1, MIA PaCa-2, BxPc-3 ja SU.86.86. Mõistmaks AHR-i rolli PDAC rakuliinides, määrati esmalt *AHR*-i ekspressioon mRNA tasemel, kasutades qPCR analüüsi. Katsete tulemusena selgus sarnaselt Koliopanos *et al.*, (2002) uuringuga, et *AHR*-i mRNA hulk on väga madal MIA PaCa-2 rakkudes (Joonis 5). PANC-1 rakkudes oli mRNA hulk 234 korda suurem kui MIA PaCa-2 rakuliinis, kuid siiski madal võrreldes teiste liinidega. BxPc-3 rakuliinis oli *AHR*-i ekspressioon 1443 korda ning SU.86.86 rakkudes 3341 korda kõrgem kui MIA PaCa-2 rakuliinis.



Joonis 5. *AHR*-i ekspressioon MIA PaCa-2, SU.86.86, BxPc-3 ja PANC-1 rakuliinides. *AHR*-i mRNA tasemed detekteeriti qPCR-i meetodil ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemused on esitatud kordarvuna MIA PaCa-2 rakuliini suhtes ning põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,05$ vs MIA PaCa-2).

Et kinnitada qPCR-is nähtud *AHR*-i ekspressiooni erinevusi, tehti järgnevalt SDS-PAGE ja *Western blot* analüüs. Kasutati *AHR*-i ning aktiivastaseid antikehasid ja tulemused normaliseeriti aktiini valgu hulga suhtes. Tulemuste analüüsiks sooritati densitomeetria ImageJ programmi abil. Sarnaselt mRNA hulgaga oli *AHR*-i valgu tase madalaim MIA PaCa-2

rakuliinis (Joonis 6). Võrreldes MIA PaCa-2 rakuliiniga, oli AHR-i tase SU.86.86 rakuliinis 285 korda, BxPc-3 rakkudes 64 ja PANC-1 rakkudes 25 korda kõrgem.



Joonis 6. AHR-i valgu tasemed MIA PaCa-2, SU.86.86, BxPc-3 ja PANC-1 rakuliinides. Western blot analüüs AHR-i ja aktiinivastaste antikehadega (A). AHR-i valgu suhteline hulk PDAC rakuliinides, määratud densitomeetrilise analüüsiga kolme korduse põhjal (B). Tulemused on esitatud kordarvudena MIA PaCa-2 rakuliini suhtes ning põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,05$ vs MIA PaCa-2).

Katsetes nähtud AHR-i mRNA ja valgu tasemete põhjal võib järeldada, et AHR on ekspresseeritud MIA PaCa-2 rakuliinis väga madalal ja PANC-1 rakkudes madalal tasemel. Need tulemused vastavad ka varasemalte uuringutele (Koliopanos *et al.*, 2002). BxPc-3 rakuliinis oli AHR-i ekspressioon kõrgem ning kõige suuremat valgu ja mRNA hulka nähti SU.86.86 rakkudes, kus varasemalt pole AHR-i ekspressioonitaset määratud. Antud tulemus on hea näide sellest, et AHR-i tase võib oluliselt varieeruda ühe vahitüübi eri rakuliinides, olles kooskõlas varasemalt publitseerituga (Lin *et al.*, 2003). Lähtuvalt sellest vajaks ka AHR-i inhibiitorite kasutamine vähiravimina individuaalset patsiendispetsiifilist lähenemist.

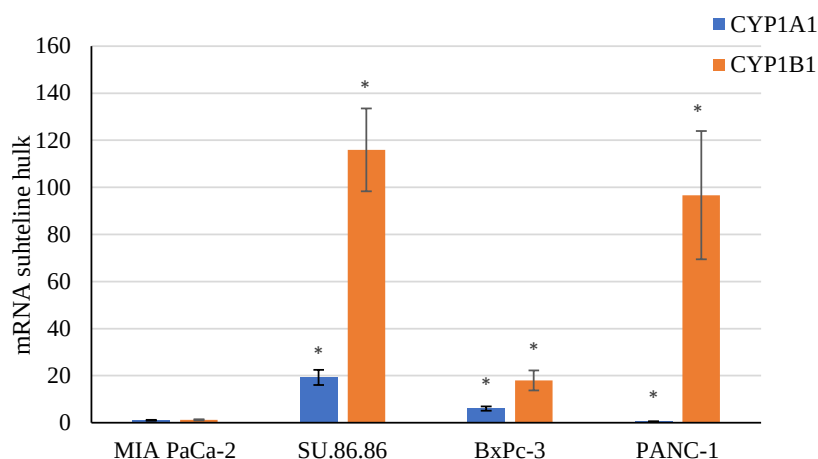
2.3.1.2. Arüülsüivesinike retseptori klassikaliste sihtmärkgeenide ekspressioon PDAC rakuliinides

Lisaks AHR-i enda ekspressioonile vaadeldi PDAC rakuliinides mRNA tasemel ka AHR-i klassikaliste sihtmärkgeenide *CYP1A1* ja *CYP1B1* ekspressiooni. See on oluline eelkõige selleks, et näha, kas AHR võiks valitud rakuliinides endogeenselt aktiivne olla ja geeniekspressiooni mõjutada.

Tehtud qPCR-i tulemustest selgus, et *CYP1A1* mRNA tasemed on vastavuses nähtud AHR-i mRNA ja valgu hulgaga. Võrreldes MIA PaCa-2 rakuliiniga, oli *CYP1A1* mRNA hulk SU.86.86 rakuliinis 19 korda ja BxPc-3 rakkudes 6 korda suurem (Joonis 7). Seevastu PANC-1 rakkudes oli *CYP1A1* ekspressioon 50% madalam. Seega madala AHR-i ekspressiooniga rakkudes oli ka *CYP1A1* mRNA hulk väike ning kõrge AHR-i ekspressiooniga rakkudes oli *CYP1A1* ekspressioonitase kõrge. Antud korrelatsioon viitab sellele, et nendes rakuliinides on

AHR endogeenselt aktiveeritud, kuna *CYP1A1* ekspressiooni indutseerimine toimub eelkõige AHR-sõltuvalt.

Rakuliinides SU.86.86, MIA PaCa-2 ja BxPc-3 vastas ka *CYP1B1* mRNA tase AHR-i ekspressiooni mõõtmisel nähtuga. Võrreldes MIA PaCa-2 rakuliiniga, oli *CYP1B1* mRNA tase SU.86.86 rakuliinis 115 korda ja BxPc-3 rakkudes 18 korda kõrgem (Joonis 7). PANC-1 rakuliinis erines *CYP1B1* mRNA hulk oodatud tulemustest. Olgugi, et AHR-i tase oli neis rakkudes madal, ekspresseeriti *CYP1B1* 96 korda rohkem kui MIA PaCa-2 rakkudes ning 5,4 korda rohkem kui BxPc-3 rakkudes. Selline tulemus viitab, et PANC-1 rakuliinis võib *CYP1B1* ekspressiooni induksioonil osaleda peale AHR-i mõni teine faktor. Samuti on varasemast teada, et erinevalt *CYP1A1* ei ole *CYP1B1* ekspressioon ilmtingimata AHR-ist sõltuv (Habano *et al.*, 2009).



Joonis 7. *CYP1A1* ja *CYP1B1* ekspressioon MIA PaCa-2, SU.86.86, BxPc-3 ja PANC-1 rakuliinides. Ekspressiooni tasemed määrati qPCR analüüsiga ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemused on esitatud kordarvudena MIA PaCa-2 rakuliini suhtes ning põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,05$ vs MIA PaCa-2).

2.3.1.4. IDO/KYN/AHR signaalraja geenide ekspressioon PDAC rakuliinides

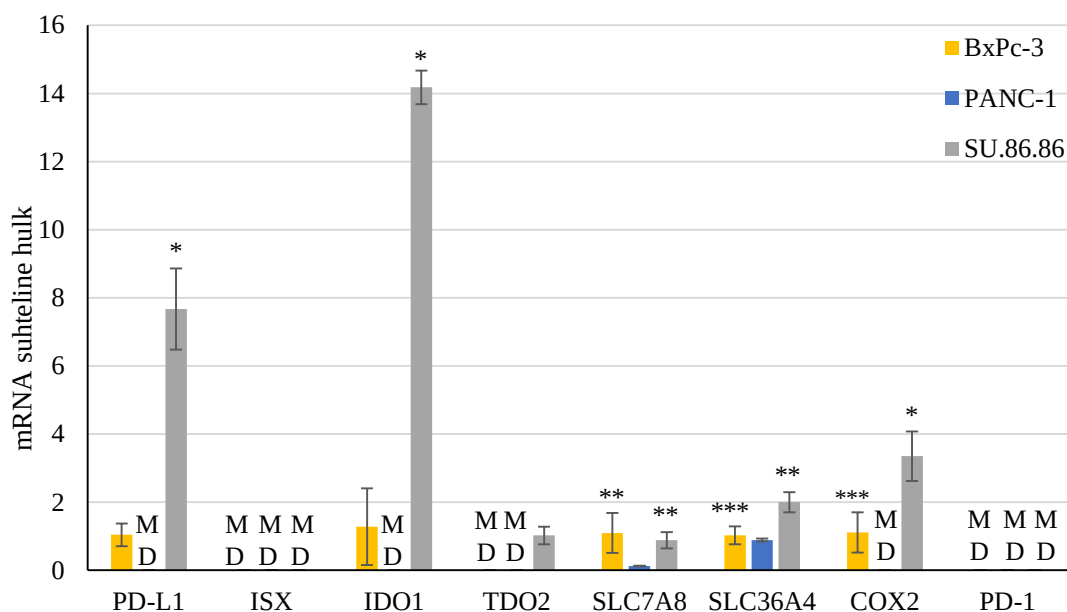
Teades, et AHR on ekspresseeritud ja aktiveerib oma sihtmärkgeeni *CYP1A1* SU.86.86, PANC-1 ja BxPc-3 rakuliinides, otsustati kontrollida, kas nendes vähirakkudes võiks olla funktsionaalne ka IDO1/KYN/AHR/ISX rada. MIA PaCa-2 rakuliinis detekteeriti nii AHR-i kui CYP-ide ekspressioone väga madalal tasemel (Joonis 5-7) ning sel põhjusel jäeti see rakuliin hilisematest katsetest välja. IDO1/KYN/AHR/ISX positiivset tagasisideringi on varasemalt näidatud maksavähi rakkudes (Wang *et al.*, 2017b). Kinnitamaks, kas see rada võib ka PDAC rakuliinides toimida, määrati valitud rakuliinides *IDO1* ja *ISX* mRNA hulgad. Lisaks vaadeldi *TDO2* hulka, sest varasemalt on näidatud, et antud ringis võib IDO1 asemel osaleda ka TDO2 (Novikov *et al.*, 2016). Lisaks on maksavähi rakkudes nähtud, et ISX indutseerib *PD-L1*

ekspressiooni (Wang *et al.*, 2017b). PD-L1 on kasvajakarakkudes ekspresseeritud pinnavalk, mis osaleb kasvajakarakkude immuunvältimises (Liu *et al.*, 2018a). Siinses töös vaadeldi nii *PD-L1* kui tema retseptori *PD-1* ekspressiooni. Kontrolliti ka KYN-i transporterite *SLC7A8* ja *SLC36A4* ekspressiooni tasemeid. Tavaliselt on need geenid ekspresseeritud CD8⁺ T-lümfotsüütides, kus vahendavad KYN-i liikumist rakku ning on AHR-i poolt indutseeritavad (Liu *et al.*, 2018a; Smyth *et al.*, 2016). Lisaks määrati *COX2* ekspressioonitase. *COX2* on mitmetes kasvajakarakkudes ekspresseeritud valk, mida seostatakse kasvaja angiogeneesi ja invasiivsuse suurenemisega ning apoptoosi inhibeerimisega (Sobolewski *et al.*, 2010). Lisaks on varasemalt rinna ja söögitoru vähirakkudes näidatud, et AHR suurendab *COX2* ekspressiooni (Degner *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2020).

Andmete analüüsil võrreldi omavahel geenide ekspressiooni varieeruvust eri rakuliinides. Üheski vaadeldud liinidest ei detekteeritud *ISX* ega *PD-1* mRNA-d (Joonis 8). *PD-L1* ekspressiooni ei detekteeritud PANC-1 rakuliinis. SU.86.86 rakuliinis oli *PD-L1* kõrgemalt ekspresseeritud kui BxPc-3 rakkudes. Sarnaselt *PD-L1*-le ei detekteeritud ka *IDO-1* mRNA-d PANC-1 rakuliinis, kuid ekspressiooni täheldati vähesel määral BxPc-3 ning tunduvalt kõrgemal tasemel SU.86.86 rakkudes. *TDO2* mRNA detekteeriti vaid SU.86.86 rakkudes. Künureniini transporterite *SLC7A8* ja *SLC36A4* ekspressiooni täheldati kõigis vaadeldud rakuliinides, kõige madalamal tasemel PANC-1 rakkudes. *SLC7A8* oli võrdselt ekspresseeritud SU.86.86 ja BxPc-3 rakuliinides ning *SLC36A4* kõrgemalt SU.86.86 rakkudes. *COX2* mRNA hulk korreleerus *AHR*-i mRNA tasemetega antud rakkudes: suurim SU.86.86 rakkudes, keskmine BxPc-3 ja PANC-1 rakuliinis *COX2* mRNA-d ei detekteeritud. *COX2* ekspressiooni puudumist PANC-1 rakuliinis on varasemalt täheldanud ka Eibl *et al.*, (2003).

Kogutud andmetest saab järeldada, et AHR võib indutseerida *IDO1* ekspressiooni, kuid mitte läbi *ISX*-i, mille mRNA-d ei detekteeritud üheski rakuliinis. On võimalik, et SU.86.86 rakkudes panustab KYN tootmisesse ka *TDO2* (Novikov *et al.*, 2016). BxPc-3 rakkudes aga ainult *IDO1*. Positiivset seost nähti ka *AHR*-i ekspressiooni ning *PD-L1* ning *COX2* mRNA hulga vahel. Seda kinnitavad ka varasemad uuringud, kus on näidatud, et *COX2* metaboliit PGE2 indutseerib *PD-L1* ekspressiooni (Markosyan *et al.*, 2013). Kokkuvõtvalt võib järeldada, et PANC-1 rakkudes ei pruugi toimida KYN/*IDO1*/*AHR* rada, sest puudub nii *IDO1* kui *TDO2* ekspressioon. Kontrollimaks hüpoteesi, et PANC-1 rakuliinis ei mängi AHR valitud geenide ekspressiooni mõjutamises olulist rolli ning et KYN/*IDO1*/*AHR*-i rada ei toimi, jätkati ka hilisemates katsetes PANC-1 rakuliiniga. BxPc-3 ja SU.86.86 rakuliinides, kus *AHR* oli

kõrgemalt ekspresseeritud võib KYN/IDO1/AHR-i rada toimida, kuid mitte ISX transkriptsioonifaktori kaudu.



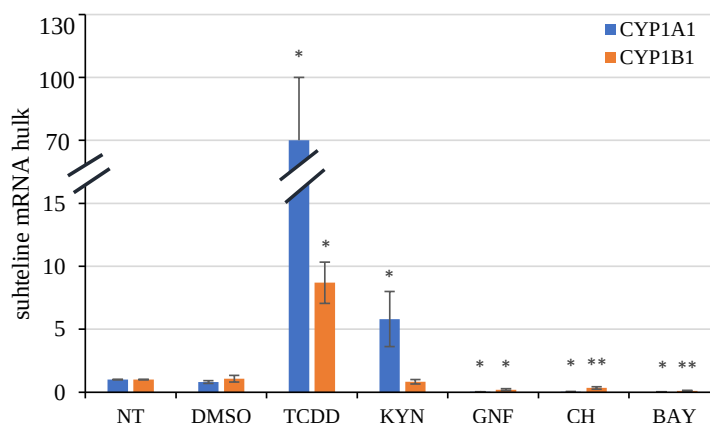
Joonis 8. PD-L1, ISX, IDO1, TDO2, SLC7A8, SLC36A4, COX2 ja PD-1 ekspressiooni tasemed BxPc-3, PANC-1 ja SU.86.86 rakuliinides. Ekspressiooni tasemed määrati qPCR analüüsiga ning normaliseeriti *TBP* suhtes. Tulemused on esitatud kordarvuna BxPc-3 rakuliini suhtes ning põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel (* $p < 0,05$ vs BxPc-3; ** $p < 0,05$ vs PANC-1; *** $p < 0,05$ vs SU.86.86; MD – mitte detekteeritud).

2.3.2. Arüülsüivesinike retseptori aktiveerimise ja inhibeerimise mõju PDAC rakuliinidele

2.3.2.1. Arüülsüivesinike retseptori aktiivsuse moduleerimise mõju klassikalistele sihtmärkgeenidele

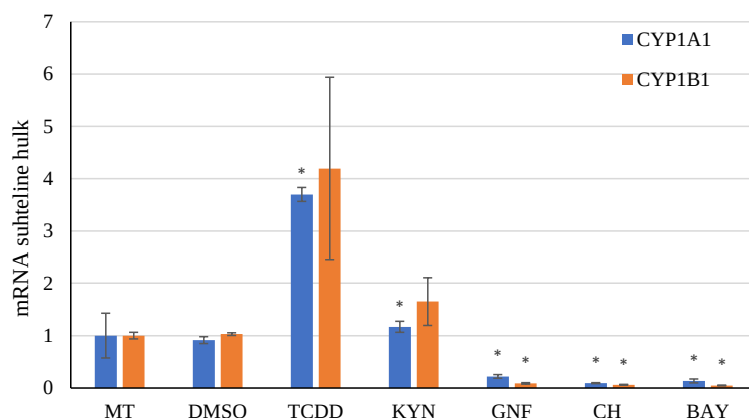
Kinnitamaks, kas eelnevates katsetes nähtud geenide ekspressioon on AHR-ist sõltuv, otsustati järgnevalt rakke töödelda AHR-i agonistide ning antagonistidega. AHR-i agonistid on molekulid, mis viivad AHR-i aktivatsiooni ja sihtmärkgeenide ekspressioonini. AHR-i antagonistid takistavad AHR-iga seondudes viimase tuuma liikumist ja sihtmärkgeenide ekspressiooni. Kontrollidena kasvatati rakke RPMI 1640 söötmes (MT – mitte töödeldud) ning 0,1% DMSO-ga söötmes. Agonistidena kasutati AHR-i afiinseimat ligandi TCDD-d (100 nM) ja endogeenset ligandi künureniin (KYN – 150 μ M). Antagonistideks valiti GNF351 (GNF – 10 μ M), CH223191 (CH – 10 μ M) ja BAY 2416964 (BAY – 10 μ M). Kemikaalide toime uurimiseks kasvatati rakke 6-kannulistel plaatidel mainitud kontsentratsioonidega. Pärast 48 tunni möödumist lüüsi rakud, puhastati RNA ja sünteesiti cDNA. Geenide ekspressiooni hinnati qPCR-i metoodikat kasutades.

Esmalt vaadeldi AHR-i klassikalisi sihtmärkgeene *CYP1A1* ja *CYP1B1*, et määrata, kas ning mis tasemel valitud kemikaalid nende ekspressiooni antud rakuliinides mõjutavad ja kui efektiivselt toimib AHR-i inhibitsioon ning aktivatsiooni. BxPc-3 rakuliinis tõusis TCDD-ga töödeldud rakkudes *CYP1A1* ekspressioon võrreldes töötlemata rakkudega 68 korda ja *CYP1B1* mRNA 8 korda (Joonis 9). *CYP1A1* mRNA 6-kordset tõusu täheldati ka endogeense ligandi KYN kasutamisel. Seevastu *CYP1B1* mRNA hulga muutust KYN-iga töödeldud rakkudes ei nähtud. AHR-i antagonistid vähendasid võrreldes DMSO-ga *CYP1A1* ekspressiooni 96–97% ning *CYP1B1* oma 66–88%. Tulemuste põhjal võib järeldada, et BxPc-3 rakuliinis viivad KYN ja TCDD AHR-i aktiveerimiseni, mis põhjustab *CYP1A1* ekspressiooni tõusu. Lisaks selgus, et AHR on endogeenselt aktiveeritud, kuna antagonistid vähendasid AHR-i sihtmärkgeenide ekspressiooni. Kuna eelnevalt täheldati BxPc-3 rakkudes *IDO1* ekspressiooni (Joonis 8) võib oletada, et AHR-i endogeenne aktivatsioon on tõenäoliselt põhjustatud *IDO1* poolt toodetud KYN-ist.



Joonis 9. AHR-i aktiivsuse moduleerimise mõju *CYP1A1* ja *CYP1B1* ekspressioonile BxPc-3 rakuliinis. BxPc-3 rakke inkubeeriti DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 µM), GNF (10 µM), CH (10 µM) ja BAY (10 µM) juuresolekul 48 tundi. Geenide ekspressioon määrati qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (MT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseival korduskatsel (* $p < 0,05$ vs DMSO).

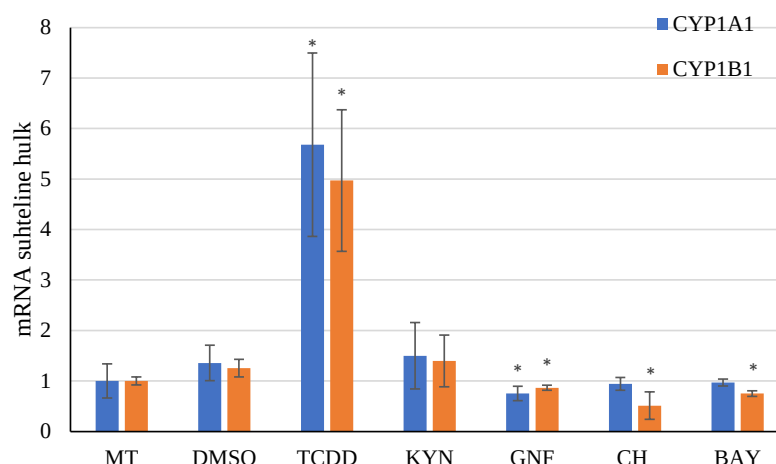
SU.86.86 rakuliinis nähti sarnaseid tulemusi BxPc-3 rakkudes täheldatuga. TCDD põhjustas kuuekordse *CYP1A1* ja 4-kordse *CYP1B1* tõusu (Joonis 10). KYN suutis marginaalselt, kuid oluliselt suurendada vaid *CYP1A1* ekspressiooni. Selle põhjus võis olla kõrge basaalne *CYP1A1* ja *1B1* ekspressioon SU.86.86 rakuliinis (Joonis 7). Seda toetab ka leid, et AHR-i aktiveerimisel SU.86.86 rakuliinis on *CYP1A1* induksioon kordades madalam kui BxPc-3 puhul. Kõik antagonistid vähendasid mõlema geeni ekspressiooni 78–95%, mis taaskord vihjab AHR-i endogeensele aktiveeritusele.



Joonis 10. AHR-i aktiivsuse moduleerimise mõju *CYP1A1* ja *CYP1B1* ekspressioonile SU.86.86 rakuliinis. SU.86.86 rakke inkubeeriti DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 µM), GNF(10 µM), CH (10 µM) ja BAY (10 µM) juuresolekul 48 tundi. Geenide ekspressioon määrati qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (MT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseival korduskatsel (* $p < 0,05$ vs DMSO).

Sarnaselt BxPc-3 ja SU.86.86 rakuliinides saadud tulemustega tõusis ka PANC-1 rakkudes *CYP1A1* mRNA hulk TCDD-ga töötlusel. Täpsemalt täheldati 5,5-kordset *CYP1A1* ekspressiooni suurenemist (Joonis 11). KYN see-eest antud geeni ekspressiooni ei mõjutanud. Antagonistidest vähendas marginaalselt, kuid siiski statistiliselt oluliselt *CYP1A1* taset, ainult GNF. TCDD-d sisaldava söötmega kasvatatud rakkudes täheldati 5-kordset *CYP1B1* ekspressiooni tõusu. KYN-il taaskord olulist mõju ei olnud. Lisaks täheldati kõigi antagonistide puhul väikest, kuid olulist ekspressiooni vähenemist. Arvestades, et PANC-1 rakkudes oli AHR-i tase madal ja *CYP1B1* suhteliselt kõrgelt ekspresseeritud (Joonis 7), võib oletada, et neis rakkudes mõjutab AHR endogeenselt aktiveerituna *CYP1B1* väga vähesel määral.

Üks võimalikest põhjustest, miks PANC-1 rakuliinis KYN töötlusega muutust *CYP*-geenide ekspressioonis ei nähtud võib olla seotud KYN transporteri *SLC7A8* madala ekspressioonitasemega (Joonis 8). Vastupidiselt TCDD-le, mis difundeerub passiivselt läbi rakumembraani, toimub KYN liikumine rakku aktiivse transpordi teel (Sinclair *et al.*, 2018). Kuigi PANC-1 rakus pole täpselt määratud, millised transporterid vahendavad peamiselt KYN liikumist rakku, võib teiste rakuliinidega võrdluses nähtud madala *SLC7A8* ekspressiooni taseme ja *CYP1A1/1B1* puuduliku indutseerimise järgi eeldada, et võrreldes teiste rakuliinidega liigub PANC-1 rakkudesse vähem KYN-i.



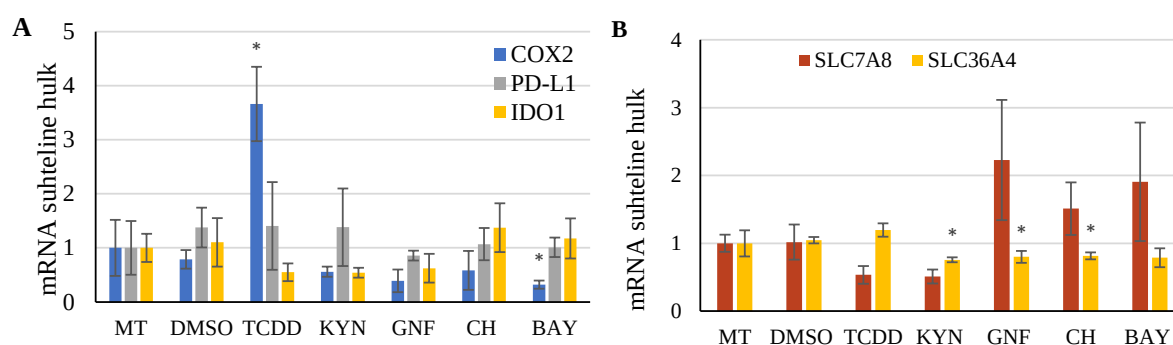
Joonis 11. AHR-i aktiivsuse moduleerimise mõju *CYP1A1* ja *CYP1B1* ekspressioonile PANC-1 rakuliinis. Panc-1 rakke inkubeeriti DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 µM), GNF (10 µM), CH (10 µM) ja BAY (10 µM) juuresolekul 48 tundi. Geenide ekspressioon määrati qPCR analüüsiga ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (MT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseival korduskatsel (* $p < 0,05$ vs DMSO).

AHR-i aktiivsuse modulaatoritega läbi viidud katsete tulemusel kinnitati, et *CYP1A1* ekspressioon on kõigis kolmes rakuliinis AHR-i poolt reguleeritav. Sarnast tulemust täheldati ka *CYP1B1* ekspressiooni puhul, kuigi väiksemal määral. Lisaks tuvastati, et antud rakuliinides on AHR endogeenselt aktiivne kuna inhibiitorid langetavad nii *CYP1A1* kui *1B1* taset võrreldes DMSO töödeldud rakkudega. Arvatavasti on rakuliinides BxPc-3 ja SU.86.86 AHR endogeenselt aktiveeritud KYN-i poolt, sest *IDO1* on vastavates rakkudes ekspresseeritud (Joonis 8). Täpsemalt uuritakse seda aga tulevikus. PANC-1 rakuliinis ei detekteeritud *IDO1* ekspressiooni ehk AHR ei pruugi olla KYN-i poolt endogeenselt aktiveeritud. PANC-1 rakkudes täheldati küll *CYP1B1* inhibitsiooni, kuid kõrge basaalne *1B1* ekspressioon viitab, et AHR ei ole peamine *CYP1B1* regulaator. Kokkuvõtvalt võib järeldada, et nendes kolmes rakuliinis on AHR nii aktiveeritav kui ka inhibeeritav. Endogeenselt aktiivne on AHR eelkõige BxPc-3 ja SU.86.86 rakuliinides.

2.3.2.2. Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju *IDO1*/*KYN*/*AHR* signaalraja geenidele

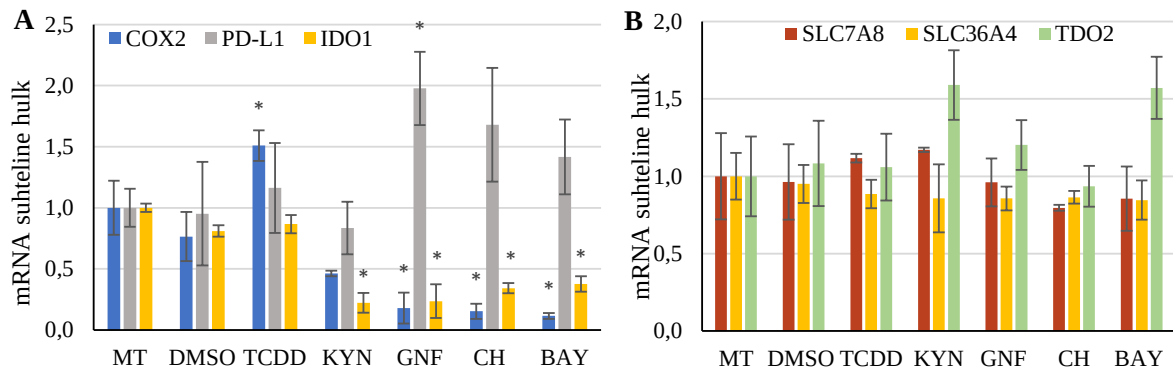
Varasemalt on näidatud, et AHR-i aktiivsuse inhibeerimine mõjutab mitmete kasvaja oluliste geenide ekspressiooni (Safe *et al.*, 2013). Seetõttu määrati järgnevalt *COX2*, *PD-L1*, *IDO1*, *SLC7A8* ja *SLC36A4* ekspressioonid PANC-1, BxPc3 ja SU.86.86 rakkudes. Lisaks määrati SU.86.86 rakkudes ka AHR-i ligandide mõju *TDO2* ekspressioonile, kuna selles rakuliinis on antud geen ainsana ekspresseeritud (Joonis 8).

BxPc-3 rakuliinis nähti, et AHR-i aktiveerimine TCDD kuid mitte KYN-iga viis *COX2* ekspressiooni 3,7-kordse tõusuni (Joonis 12 A). Kasutatud AHR-i inhibiitoritest vähendas rakus *COX2* mRNA hulka vaid BAY – 69% võrra. Sellest võib järeldada, et *COX2* ekspressioon BxPc-3 rakkudes on kontrollitud AHR-i poolt ning selle aktiivsuse inhibeerimisel on potentsiaali suurendada antud rakkude apoptoosi. *PD-L1*, *IDO1* ja *SLC7A8* geenide puhul ei omanud AHR-i agonistid ega antagonistid statistiliselt olulist efekti. *SLC36A4* ekspressioonitase seevastu vähenes 20% GNF ja CH-töötlusega (Joonis 12 B). Huvitaval kombel vähendas *SLC36A4* ekspressiooni ka KYN – 25% võrra. Olgugi, et muutused olid marginaalsed, tundub et AHR on võimeline *SLC36A4* ekspressiooni sellegipoolest mõjutama.



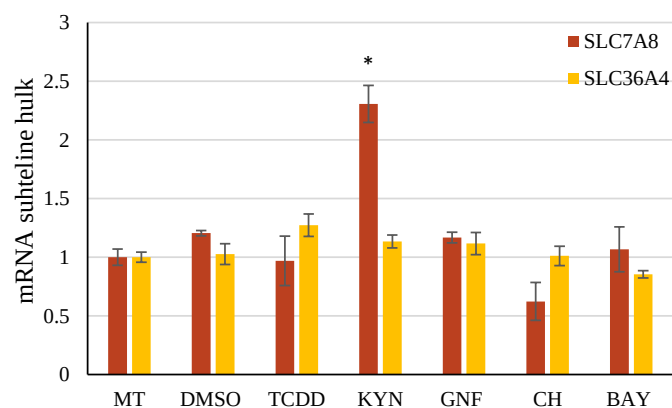
Joonis 12. AHR-i aktiivsuse moduleerimise mõju geeniekspressioonile BxPc-3 rakuliinis. BxPc-3 rakke inkubeeriti DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 μ M), GNF (10 μ M), CH (10 μ M) ja BAY (10 μ M) juuresolekul 48 tundi. *COX2*, *PD-L1*, *IDO1* (A) ja *SLC7A8* ning *SLC36A4* (B) ekspressioonitasemed mõõdeti qPCR-i teel ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetööteldud (MT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseival korduskatsel (* $p < 0,05$ vs DMSO).

SU.86.86 rakuliinis, kus *AHR* oli valitud rakuliinidest ekspresseeritud kõige kõrgemal tasemel, nähti TCDD-ga *AHR*-i aktiveerides *COX2* mRNA hulga 1,5-kordset tõusu. GNF, CH ja BAY töötluse tagajärjel täheldati keskmiselt 85% võrra väiksemat *COX2* ekspressiooni (Joonis 13A). Huvitaval kombel tõstis *AHR*-i antagonist GNF *PD-L1* ekspressiooni 1,9 korda, samas kui TCDD, KYN, CH ja BAY puhul ei täheldatud olulist muutust. *IDO1* geeni puhul ei nähtud *AHR*-i aktiveerimisel TCDD-ga mRNA tasemetes muutust. Seevastu langetasid *IDO1* ekspressiooni nii KYN (78%) kui ka GNF (77%), CH (66%) ja BAY (63%). *SLC7A8*, *SLC36A4* ja *TDO2* ekspressioonile *AHR*-i aktiivsuse moduleerimisel mõju ei olnud (Joonis 13B).



Joonis 13. AHR-i aktiivsuse moduleerimise mõju geeniekspressioonile SU.86.86 rakuliinis. SU.86.86 rakke inkubeeriti DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 μ M), GNF (10 μ M), CH (10 μ M) ja BAY (10 μ M) juuresolekul 48 tundi. *COX2*, *PD-L1*, *IDO1* (A) ja *SLC7A8* ning *SLC36A4* (B) ekspressioonitasemed mõõdeti qPCR-i teel ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (MT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseival korduskatsel (* $p < 0,05$ vs DMSO).

PANC-1 rakkudes, kus *AHR*-i ekspressioon oli madal võrreldes BxPc-3 ja SU.86.86 rakuliinidega, ei detekteeritud kemikaalidega töötlemata rakkudes *COX2*, *PD-L1* ja *IDO1* mRNA-d (Joonis 8). Samuti ei detekteeritud antud geenide ekspressiooni pärast *AHR*-i inhibeerimist ega aktiveerimist. *SLC7A8* ja *SLC36A4* madalat ekspressiooni see-eest PANC-1 rakkudes detekteeriti (Joonis 14). Olgugi, et TCDD ja antagonistid ei mõjutanud *SLC7A8* ekspressiooni, suurendas KYN 2,4 korda selle mRNA taset. See on kooskõlas varasemalt näidatuga, kus CD8⁺ T-rakkudes näidati *AHR*-i seondumist *SLC7A8* promootorile ning selle ekspressiooni tõusu KYN töötlemise tagajärjel (Liu *et al.*, 2018b).

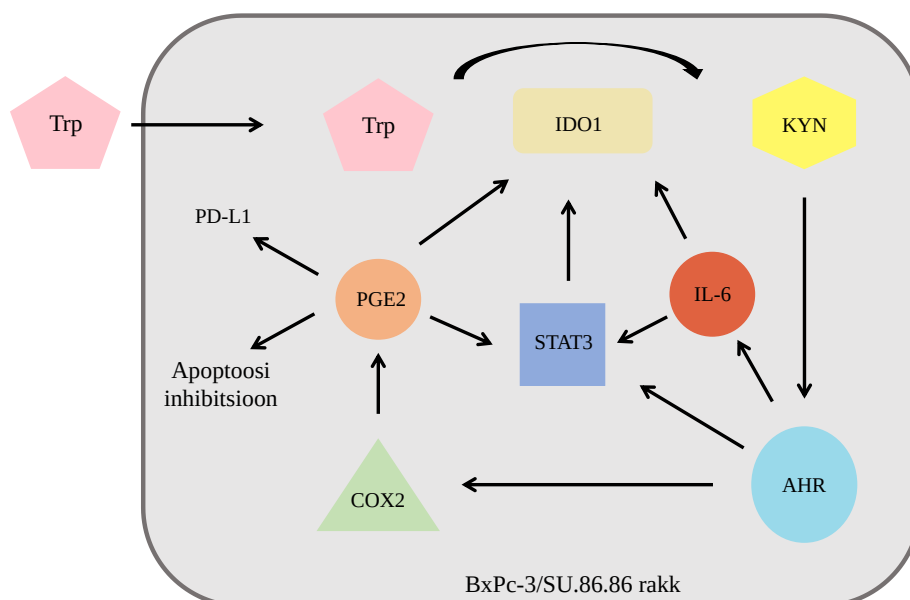


Joonis 14. AHR-i aktiivsuse moduleerimise mõju geeniekspressioonile PANC-1 rakuliinis. PANC-1 rakke inkubeeriti DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 μ M), GNF (10 μ M), CH (10 μ M) ja BAY (10 μ M) juuresolekul 48 tundi. *SLC7A8* ning *SLC36A4* ekspressioonitasemed mõõdeti qPCR-i teel ja normaliseeriti *TBP*-ga. Tulemused on esitatud kordarvuna mittetöödeldud (MT) rakkude suhtes ning põhinevad kolmel iseseival korduskatsel (* $p < 0,05$ vs DMSO).

Saadud tulemused, kus *AHR*-i aktiivsuse mõjutamine erinevate agonistidega ja antagonistidega põhjustab eri muutusi geeniekspressioonis, on heaks näiteks *AHR*-i keerulisest iseloomust.

Täpsemalt on varemgi teaduspublikatsioonides rõhutatud, et AHR-i funktsioon võib suurelt varieeruda nii mudelorganismist ja rakutüübist, milles seda uuritakse, kui ka agonistist või antagonistist, millega selle aktiivsust mõjutatakse (Jin *et al.*, 2015; Nault *et al.*, 2013; Ogura *et al.*, 2017; Safe *et al.*, 2013). Antud tulemused kinnitavad ka, et PANC-1 rakuliinis ei toimi IDO1/KYN/AHR rada, sest puudub *IDO1* ekspressioon ning samal põhjusel pole ka AHR KYN-i poolt endogeenselt aktiveeritud. Tulemused näitavad, et nii BxPc-3 kui SU.86.86 rakkudes on COX2 AHR-i poolt indutseeritav. SU.86.86 rakkudes korreleerub AHR-i moduleerimise ja COX2 hulga ka *IDO1* ekspressioon, mis annab alust oletada, et antud rakkudes toimib positiivne tagasisidering IDO1/KYN/AHR/COX2.

Varasemad tööd näitavad, et COX2 on võimeline läbi PGE2 indutseerima *IDO1* ekspressiooni (Hennequart *et al.*, 2017). Kuigi BxPc-3 rakkudes reguleerib AHR COX2 ekspressiooni, puudus korrelatsioon IDO1-ga, mis jätab lahtiseks küsimuse, kas antud rakkudes toimib IDO1/KYN/AHR rada ning kas selles osaleb IDO1 või näiteks IDO2 (Godin-Ethier *et al.*, 2011). Varasemalt on näidatud, et PGE2 suurendab *PD-L1* ekspressiooni, kuid SU.86.86 rakkudes täheldati COX2 ekspressiooni langusega samaaegset *PD-L1* ekspressiooni tõusu (Markosyan *et al.*, 2013). Nende mõnevõrra vastuoluliste tulemuste selgitamiseks on tulevikus plaanis määrata rakkudes PGE2 taset ning selgitada eksogeense PGE2 toimet geeniekspressioonile. Lisaks on COX2/PGE2 rada seostatud kasvajates apoptoosi inhibitsiooni, invasiivsuse ja angiogeneesi suurenemisega ning on näidatud, et PGE2 on võimeline indutseerima *STAT3* ekspressiooni (Joonis 15) (Sobolewski *et al.*, 2010). *STAT3* on üks võimalikest faktoritest, mille kaudu võib käia *IDO1* indutseerimine (Litzenburger *et al.*, 2014). Peale PGE2 võib *STAT3* ekspressiooni reguleerida ka AHR. Võimalik, et *IDO1* indutseerimine käib ka läbi IL-6, mille ekspressiooni on AHR võimeline suurendama (DiNatale *et al.*, 2010b). Peale *IDO1* indutseerimise on IL-6 võimeline ka *STAT3* ekspressiooni suurendama (Litzenburger *et al.*, 2014). Et kinnitada, kas ka PDAC rakkudes võib IDO1/KYN/AHR rajas osaleda *STAT3* või IL-6 on tulevikus plaanis määrata nii nende ekspressiooni kui ka mõjutada nende valkude tasemeid RNA interferentsi abil.



Joonis 15. Võimalik IDO1/KYN/AHR rada PDAC rakkudes.

2.3.2.3. Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju PDAC rakuliinide kasvukiirusele

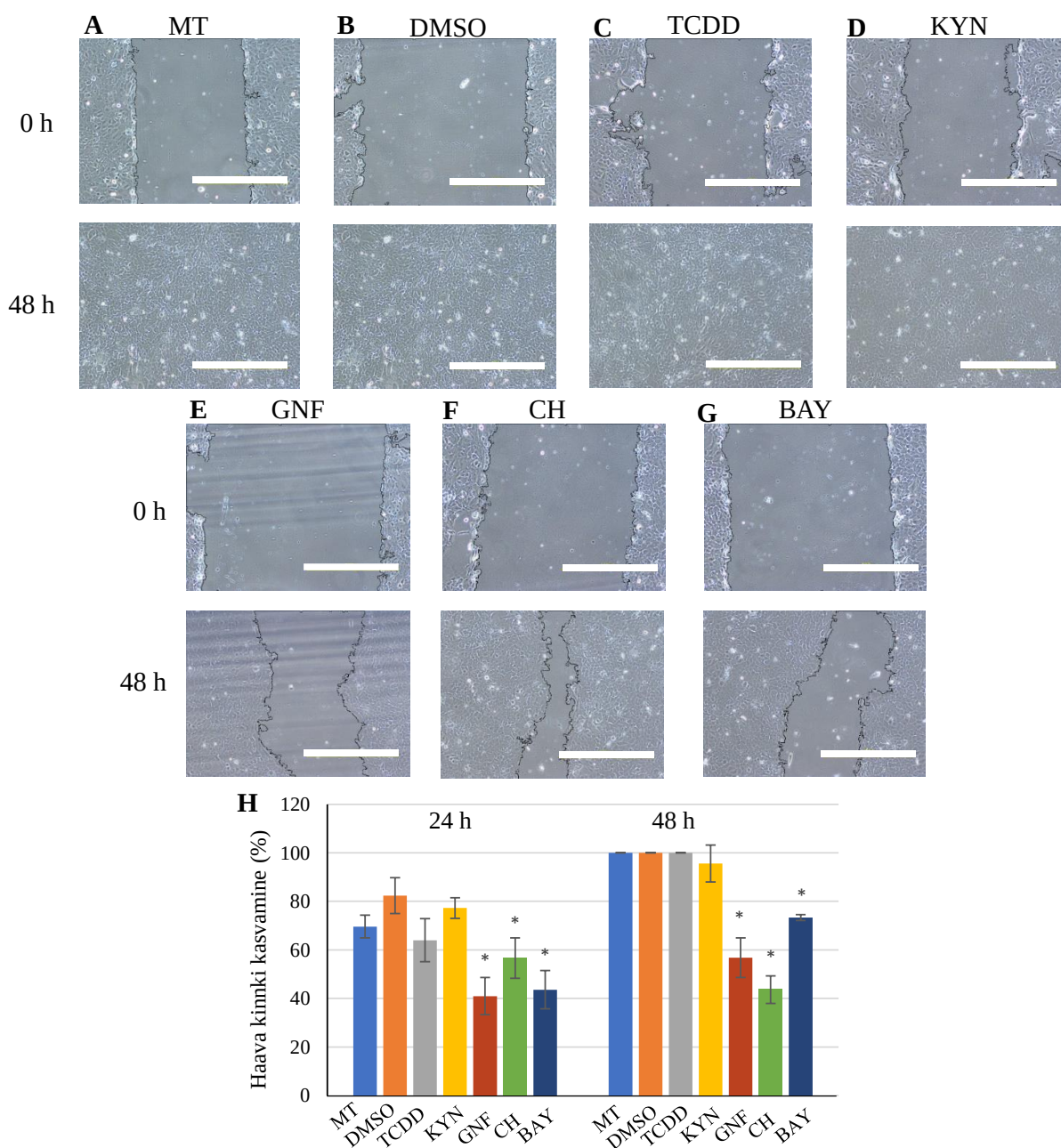
Testimaks, kas AHR-i aktiveerimine või inhibeerimine viib ka valitud rakuliinide kasvukiiruse muutusteni, tehti paralleelselt kemikaalitöötlemisega haavakatse. Varasemalt on AHR-i kõrget ekspressiooni kasvajas seostatud migratsiooni, invasiivsuse ja proliferatsiooni suurenemisega (Safe *et al.*, 2013). Samuti on COX2 puhul näidatud selle võimet inhibeerida apoptoosi ja suurendada migratsiooni (Sobolewski *et al.*, 2010). Kasutatud PDAC rakuliinid oli võrdlemisi aeglaselt kasvavad ning sel põhjusel nähti enamasti olulist muutust kasvus alles 48 tunniks (Deer *et al.*, 2010).

BxPc-3 rakuliinis kasvasid töötlemata, DMSO, TCDD ja KYN töödeldud rakkudel haavad 48 tunniks kinni, samas kui AHR-i inhibiitoritega kasvatatud rakkudel jäi haav avatuks (Joonis 16). Seejuures oli nende rakkude puhul kasvukiiruse vähenemine antagonistidega märgata juba 24 tunni möödudes. Katse tulemusena võib järeldada, et AHR-i inhibiitorite mõjul toimub rakkude kasvukiiruse vähenemine ja et AHR on oluline BxPc-3 rakkude kasvus.

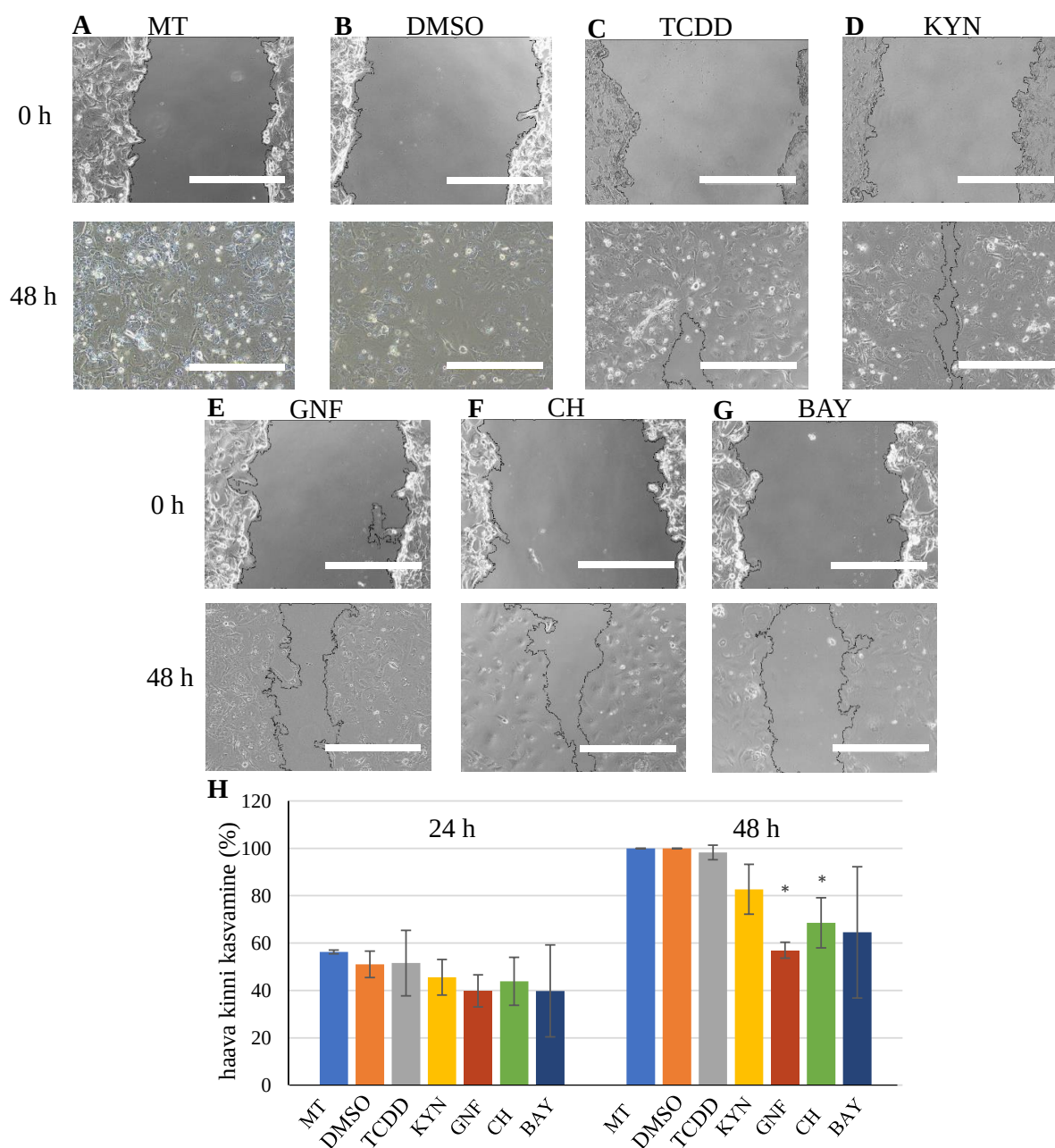
SU.86.86 rakuliinis 24 h ajapunktil olulist kasvukiiruse muutust ei täheldatud. Seevastu 48 tunni möödudes nähti olulist kasvukiiruse vähenemist GNF ja CH inhibiitoritega töödeldud rakkudes (Joonis 17). TCDD-ga kasvatatud rakkude kasvukiirus oli sarnane töötlemata ja DMSO-ga kasvatatud rakkude omale. Nii SU.86.86 kui BxPc-3 rakuliinis täheldati COX2 ekspressiooni vähenemist AHR-i aktiivsuse inhibeerimisega. Arvestades, et COX2 on suuteline apoptoosi inhibeerima ja rakkude migratsiooni suurendama, on võimalik, et haavakatses nähtud kasvu inhibitsioon käib läbi AHR/COX2 raja.

Sarnaselt BxPc-3 ja SU.86.86 rakuliiniga täheldati PANC-1 puhul TCDD ka KYN-iga kasvatatud rakkudes sarnast haava sulgumise kiirust DMSO ja mittetöödeldud kontrolliga (Joonis 18). Antagonistide GNF ja CH puhul täheldati nii 24 kui ka 48 tunni järel, et haav oli võrreldes DMSO-ga kasvatatud rakkudega vähem kinni kasvanud (Joonis 18 H). Kuigi eelnevad katsed näitasid, et IDO1/KYN/AHR-i rada PANC-1 rakkudes ei toimi, võib haavakatsel saadud tulemustest järeldada, et AHR on siiski oluline PANC-1 rakuliinis vähirakkude kasvuks.

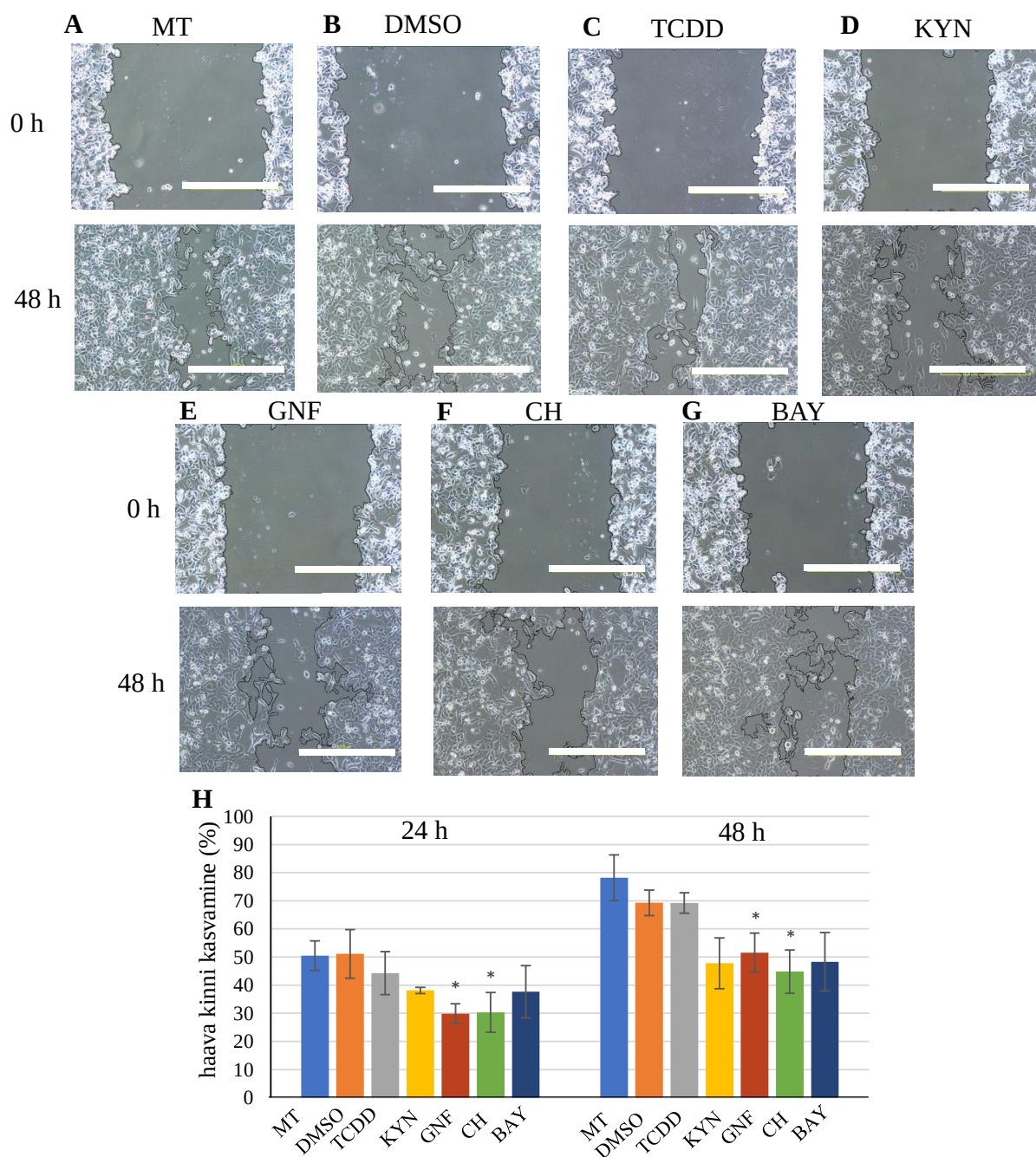
Antud katsetest saame järeldada, et nii PANC-1, BxPc-3 kui SU.86.86 rakkudes on AHR oluline rakkude kasvukiiruse mõjutamisel. Sarnaseid tulemusi on ka maokasvajas täheldatud (Yin *et al.*, 2013). Kuigi kasvukiiruse inhibitsioon toimub kõigis rakuliinides, ei saa tulemuste järgi väita, et AHR mõjutab kasvu ühesuguse mehhanismi järgi. On tõenäoline, et BxPc-3 ja SU.86.86 rakuliinides osaleb kasvu regulatsioonil nii COX2 kui selle metaboliit PGE2, samas kui PANC-1 rakkudes on see vähetõenäoline. Arvatavasti toimub kasvu inhibeerimine PANC-1 rakuliinis teise AHR-ist sõltuva mehhanismi kaudu. Näiteks on täheldatud, et AHR on kasvajates võimeline reguleerima kasvufaktorite ekspressiooni (John *et al.*, 2014). Samuti ei saa välistada, et ka SU.86.86 ja BxPc-3 rakuliinides toimub kasvukiiruse mõjutamine näiteks kasvufaktorite reguleerimise kaudu. Et selgusele jõuda, kas valitud rakuliinides vastutab kasvukiiruse inhibitsiooni eest AHR/COX2/PGE2 rada, on tulevikus plaanis määrata rakkudes nii PGE2 taset kui ka selgitada eksogeense PGE2 mõju antud rakuliinide kasvukiirusele.



Joonis 16. BxPc-3 rakuliini haavakatse. BxPc-3 rakke kasvatati 6-kannulistel plaatidel konfluentsuseni, misjärel tõmmati 200 µl pipetiotsikuga haav rakkude sisse. Rakke inkubeeriti 48 tundi DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 µM), GNF (10 µM), CH (10 µM) ja BAY (10 µM) juuresolekul. Haava pildid ajapunktidel 0 h ja 48 h (A-G), märgitud mõõtkava on suurusega 500 µm. Haava kinni kasvamine (%) ajapunktidel 24 h ja 48 h (H). Tulemused on esitatud 0 h ajapunkti suhtes kolme iseseiva korduskatse põhjal (* $p < 0,05$ vs DMSO).



Joonis 17. SU.86.86 rakuliini haavakatse. SU.86.86 rakke kasvatati 6-kannulistel plaatidel konfluentsuseni, misjärel tõmmati 200 µl pipetiotsikuga haav rakkude sisse. Rakke inkubeeriti 48 tundi DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 µM), GNF (10 µM), CH (10 µM) ja BAY (10 µM) juuresolekul. Haava pildid ajapunktidel 0 h ja 48 h (A-G), märgitud mõõtkava on suurusega 500 µm. Haava kinni kasvamise (%) ajapunktidel 24 h ja 48 h (H). Tulemused on esitatud 0 h ajapunkti suhtes kolme iseseiva korduskatse põhjal (* p < 0,05 vs DMSO).



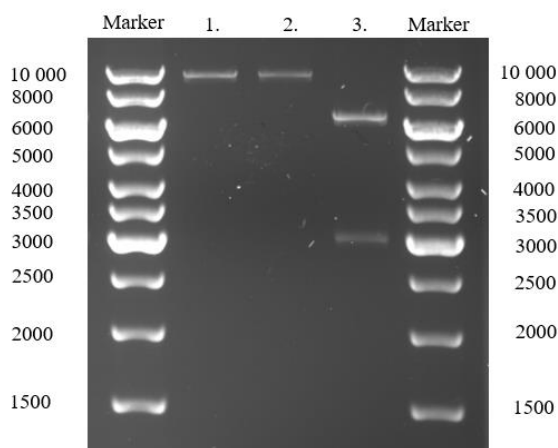
Joonis 18. PANC-1 rakuliini haavakatse. PANC-1 rakke kasvatati 6-kannulistel plaatidel konfluentsuseni, misjärel tõmmati 200 µl pipetiotsikuga haav rakkude sisse. Rakke inkubeeriti 48 tundi DMSO, TCDD (100 nM), KYN (10 µM), GNF (10 µM), CH (10 µM) ja BAY (10 µM) juuresolekul. Haava pildid ajapunktidel 0 h ja 48 h (A-G), märgitud mõõtkava on suurusega 500 µm. Haava kinni kasvamine (%) ajapunktidel 24 h ja 48 h (H). Tulemused on esitatud 0 h ajapunkti suhtes kolme iseseiva korduskatse põhjal (* $p < 0,05$ vs DMSO).

2.3.3. AHR-spetsiifilise CRISPR-Cas9 plasmidi konstrueerimine

Selgitamaks, kas eelpool nähtud AHR-i aktiivsuse moduleerimise efektid nii geeniekspressioonile kui ka kasvukiirusele on tingitud spetsiifiliselt AHR-ist, plaanitakse tulevikus luua AHR-nokaut rakuliinid, kasutades CRISPR-Cas9 tehnoloogiat.

Vektoriks valiti plasmiid PX458, mis sisaldas ampitsilliini resistentsusgeeni, BbsI ja NotI lõikekohtasid ning Cas-9 geeni. Esmalt lõigati plasmidi BbsI restriктаasiga ning ligeeriti varasemalt kokku sulatatud oligonukleotiidid plasmidi. Disainitud oligonukleotiididelt ekspresseeritakse rakus gRNA, mis on komplementaarne AHR-i esimeses eksonis asuva järjestusega.

Kontrollimaks gRNA oligonukleotiidide liitumist plasmiidiga, tehti NotI restriksioon. PX458 plasmiidil on kaks NotI restriктаasi lõikamiskohta. Oligonukleotiidi ligeerimisel plasmidi, kaob üks NotI lõikamiskoht ja restriksioonil moodustub lineaarne 10000 aluspaari suurune DNA fragment. PX458 WT plasmidi lõikamisel NotI restriктаasiga moodustub kaks DNA fragmenti, mis on 7000 ja 3000 aluspaari suurused. Restriksiooni tulemus visualiseeriti geelelektroforeesil. Joonisel 19 on näha kahte PX458 plasmidi, kuhu on liidetud oligonukleotiidid (Rida 1 ja 2), ja üks WT plasmiid (Rida 3), mida kasutati negatiivse kontrollina, millel on toimunud NotI restriksioon kahes kohas. Antud tulemus viitab sellele, et plasmidi konstrueerimine oli edukas. Seda kinnitas ka Sangeri sekveneerimine. Konstrueeritud plasmiid on järgnevalt plaanis transfekteerida PDAC rakuliinidesse, selgitamaks kas eelpool täheldatud AHR-i antagonistide mõju on tingitud spetsiifiliselt AHR-i aktiivsuse vähenemisest.



Joonis 19. NotI restriksiooni produktid visualiseeritud geelelektroforeesil. Real 1 ja 2 on PX458 plasmiid, kuhu on ligeeritud AHR-i spetsiifilise gRNA oligonukleotiid. Real 3 on WT PX458 plasmiid, mida kasutati negatiivse kontrollina.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli määrata arüülsüivesinike retseptori ekspressiooni ja funktsionaalsust pankreasejuha adenokartsinoomi rakkudes SU.86.86, PANC-1, MIA PaCa-2 ja BxPc-3. Vaadeldi, kas AHR mõjutab geenide ekspressiooni, mis on varasemalt seostatud kasvaja proliferatsiooni, invasiivsuse, metastaseerumise ning immuunvältimisega. Lisaks määrati, kas AHR-i aktiivsuse moduleerimine mõjutab rakuliinide kasvukiirust.

Antud bakalaureusetöö eksperimentaalse osa tulemusena selgus, et *AHR* on ekspresseeritud PDAC rakuliinides väga erinevatel tasemetel. Kõige kõrgemat taset nähti SU.86.86 rakkudes, keskmist BxPc-3, madalat PANC-1 rakuliinides ning MIA PaCa-2 rakkudes detekteeriti väga vähe AHR-i. Kontrolliti ka AHR-i sihtmärkgeenide *CYP1A1/1B1* ekspressiooni rakuliinides, mis vastasid üldjoontes AHR-i hulgale vastavas rakuliinis. Järgmisena vaadeldi geenide ekspressiooni, mida on varasemalt seostatud vähirakkude apoptoosi ja immuunvältimisega. SU.86.86 ja BxPc-3 rakkudes täheldati *IDO1*, *COX2*, *PD-L1*, *SLC7A8*, *SLC36A4* geenide ekspressiooni ning vaid SU.86.86 rakuliinis *TDO2* ekspressiooni. PANC-1 rakkudes detekteeriti vaid vähesel määral *SLC7A8* ja *SLC36A4* mRNA-d. Määramaks AHR-i mõju antud geenidele töödeldi rakke AHR-i aktiveerivate agonistide ja inaktiveerivate antagonistidega. BxPc-3 ja SU.86.86 rakuliinides inhibeerisid antagonistid CH223191, BAY 2416964, GNF351 *COX2*, samas kui agonist TCDD viis ekspressiooni tõusuni. SU.86.86 rakkudes nähti ka *IDO1* ekspressioonil muutust. Määramaks AHR-i mõju rakuliinide kasvule viidi läbi haavakatse, mille tulemused näitasid, et AHR-i inhibiitorid viisid kasvu aeglustumiseni kõigis kolmes rakuliinis, mis viitab sellele, et AHR on oluline faktor antud vähirakkude kasvukiiruse reguleerimisel.

Kokkuvõttes näidati käesolevas bakalaureusetöös, et *AHR*-i ekspressioon varieerub eri PDAC rakuliinides. Määrati, et AHR on endogeenselt aktiivne BxPc-3, SU.86.86 ja PANC-1 rakuliinides ning et arvatavasti on BxPc-3 ja SU.86.86 rakkudes AHR-i endogeenseks aktivaatoriks KYN, sest nendes rakkudes detekteeriti KYN metaboliseeriva ensüümi *IDO1* ekspressioon. Lisaks nähti, et AHR on teatud puhkudel võimeline mõjutama *IDO1/KYN/AHR* signaalraja geene ning SU.86.86, PANC-1 ja BxPc-3 rakuliinide kasvukiirust.

“Effects of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonists on gene expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells”

Pauliine Konsa

SUMMARY

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common type of pancreatic cancer and has a high mortality rate. PDAC high mortality rate is caused by late diagnosis and resistance to treatments such as chemotherapy and radiation. Search for new treatment targets is ongoing. AHR is a transcription factor that is often upregulated in cancer cells. *AHR* expression has been shown to be higher in PDAC cells compared to non-cancerous pancreatic cells. AHR has many functions of which are related to environmental chemical metabolism. In cancers, high expression of *AHR* has been linked to increased cell invasion, migration, proliferation and metastasis. On the other hand, AHR activation by certain ligands can lead to cancer cell growth inhibition and apoptosis. AHR activation by endogenous ligand KYN will lead to formation of IDO1/KYN/AHR positive feedback loop, which has been shown to lead to poorer outcomes in cancer patients. KYN is metabolized from amino acid tryptophan by IDO1 enzyme. KYN activated AHR translocates to the nucleus and upregulates genes like *IL-6*, *COX2*, *STAT3*, *ISX* and *CYP1A1/1B1*. *STAT3*, *IL-6*, *COX2* have been show to increase *IDO1* expression and thus form a positive feedback loop increasing AHR activation by KYN. In PDAC cells, IDO1/KYN/AHR pathway has not yet been studied and could potentially contain new targets for cancer treatment.

One of the aims of this study was to identify *AHR* expression in human pancreatic cancer cell lines MIA PaCa-2, SU.86.86, PANC-1 and BxPc-3. It was discovered that levels of AHR vary widely between these lines. In MIA PaCa-2 almost no expression was detected so no further experiments were conducted with that cell line. Highest amount of AHR was detected in SU.86.86 cells, moderate amount in BxPc-3 and less in PANC-1. Secondly, IDO1/KYN/AHR pathway related genes' expression was analyzed. *ISX* and *PD-1* were not detected in any of the cell lines. *TDO2* expression was only seen in SU.86.86 cells. In BxPc-3 and SU.86.86, a correlation between AHR and *PD-L1*, *COX2* and *IDO1* expression was identified. To test whether these genes are regulated by AHR, cell treatment with AHR inhibitors and activators was performed. In PANC-1 cell line, no correlation was seen. In SU.86.86 and BxPc-3 cells *COX2* was upregulated with AHR activation and downregulated by AHR inhibition. In SU.86.86 cells *IDO1* expression was also seen to be induced by AHR. *PD-L1* showed reverse effect to AHR inhibition and activation in SU.86.86 cells. In BxPc-3 cell line, no effect was seen on *IDO1* or *PD-L1* expression. It was also determined that AHR is endogenously active

in PANC-1, BxPc-3 and SU.86.86 cells, because inhibition of AHR lead to downregulation of AHR target genes *CYP1A1* and *1B1*. In BxPc-3 and SU.86.86 AHR is probably endogenously activated by KYN because *IDO1* expression was detected. A wound healing assay was performed to measure the effect of AHR activity modulation on cell growth rate. The results showed that AHR inhibitors significantly decreased cell growth. This indicates that AHR might be an important regulator of growth in PDAC cell lines.

In conclusion, it was determined that AHR is an important transcription factor in SU.86.86, PANC-1 and BxPc-3 cancer cell lines necessary for cell growth and gene expression. In SU.86.86 and BxPc-3 cells, AHR might be part of the IDO/KYN/AHR pathway and responsible for regulating *COX2* expression.

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

Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hanberg, A. and Poellinger, L. (2002). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9990–9995.

van Baren, N. and Van den Eynde, B.J. (2016). Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front. Immunol.* 6, 34.

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.

Bjeldanes, L.F., Kim, J.-Y., Grose, K.R., Bartholomew, J.C. and Bradfield, C.A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 9543–9547.

Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P. and Buscail, L. (2016). Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur. J. Cancer* 54, 75–83.

Chesire, D.R., Dunn, T.A., Ewing, C.M., Luo, J. and Isaacs, W.B. (2004). Identification of aryl hydrocarbon receptor as a putative Wnt/ β -catenin pathway target gene in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64, 2523–2533.

Chopra, M., Dharmarajan, A.M., Meiss, G. and Schrenk, D. (2009). Inhibition of UV-C Light-Induced Apoptosis in Liver Cells by 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *Toxicol. Sci.* 111, 49–63.

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.

- Deer, E.L., González-Hernández, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C.L., Firpo, M.A. and Mulvihill, S.J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39, 425.
- Degner, S.C., Papoutsis, A.J., Selmin, O. and 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. *J. Nutr.* 139, 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.
- Denison, M.S., Fisher, J. and Whitlock Jr, J. (1988). The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J. Biol. Chem.* 263, 17221–17224.
- DiNatale, B.C., Murray, I.A., Schroeder, J.C., Flaveny, C.A., Lahoti, T.S., Laurenzana, E.M., Omiecinski, C.J. and Perdew, G.H. (2010a). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol. Sci.* 115, 89–97.
- DiNatale, B.C., Schroeder, J.C., Francey, L.J., Kusnadi, A. and Perdew, G.H. (2010b). Mechanistic insights into the events that lead to synergistic induction of interleukin 6 transcription upon activation of the aryl hydrocarbon receptor and inflammatory signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 24388–24397.
- 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). PGE2 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.
- 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.

Godin-Ethier, J., Hanafi, L.-A., Piccirillo, C.A. and Lapointe, R. (2011). Indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clin. Cancer Res.* 17, 6985–6991.

Habano, W., Gamo, T., Sugai, T., Otsuka, K., Wakabayashi, G. and Ozawa, S. (2009). CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. *Int. J. Oncol.* 34, 1085–1091.

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.

Hennequart, M., Pilotte, L., Cane, S., Hoffmann, D., Stroobant, V., De Plaen, E. and Van den Eynde, B.J. (2017). Constitutive IDO1 expression in human tumors is driven by cyclooxygenase-2 and mediates intrinsic immune resistance. *Cancer Immunol. Res.* 5, 695–709.

Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J. and Kern, S.E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 2969–2972.

Huang, T.-C., Chang, H.-Y., Chen, C.-Y., Wu, P.-Y., Lee, H., Liao, Y.-F., Hsu, W.-M., Huang, H.-C. and Juan, H.-F. (2011). Silencing of miR-124 induces neuroblastoma SK-N-SH cell differentiation, cell cycle arrest and apoptosis through promoting AHR. *FEBS Lett.* 585, 3582–3586.

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.

Jahedi, H., Fahud, A.L. and Lim, C.L. (2019). Role of p53 family isoforms in enhancing aggressiveness and chemoresistance in pancreatic cancer. *World Acad. Sci. J.* 1, 236–246.

- 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.
- John, K., Lahoti, T.S., Wagner, K., Hughes, J.M. and Perdew, G.H. (2014). The Ah receptor regulates growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* 53, 765–776.
- 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, 6059–6070.
- Kingisepp, P.-H. (2019). Kõhunäärme Langerhansi saared, p. 230. *In* Kingisepp, P.-H., Inimese füsioloogia, 7th ed., Atlex, Tartu.
- 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
- Lee, J.-E. and Safe, S. (2000). 3', 4'-Dimethoxyflavone as an aryl hydrocarbon receptor antagonist in human breast cancer cells. *Toxicol. Sci.* 58, 235–242.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Lin, P., Chang, H., Tsai, W.-T., Wu, M.-H., Liao, Y.-S., Chen, J.-T. and Su, J.-M. (2003). Overexpression of aryl hydrocarbon receptor in human lung carcinomas. *Toxicol. Pathol.* 31, 22–30.
- Litzenburger, U.M., Opitz, C.A., Sahm, F., ... Platten, M. (2014). Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget* 5, 1038.

- Liu, Y., Lv, J. and Huang, B. (2018a). Mediating the death of dormant tumor cells. *Molecular & Cellular Oncology* 5, e1458013.
- Liu, Y., Liang, X., Dong, W., ... Huang, B. (2018b). Tumor-repopulating cells induce PD-1 expression in CD8⁺ T cells by transferring kynurenine and AhR activation. *Cancer Cell* 33, 480–494.
- Ma, Q. (2001). Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr. Drug Metab.* 2, 149–164.
- Mandal, P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. B* 175, 221–230.
- Markosyan, N., Chen, E.P., Evans, R.A., Ndong, V., Vonderheide, R.H. and Smyth, E.M. (2013). Mammary Carcinoma Cell Derived Cyclooxygenase 2 Suppresses Tumor Immune Surveillance by Enhancing Intratumoral Immune Checkpoint Activity. *Breast Cancer Res.* 15, 1–13.
- McDonnell, A.M. and Dang, C.H. (2013). Basic review of the cytochrome p450 system. *J. Adv. Pract. Oncol.* 4, 263.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & Development* 13, 20–25.
- Moennikes, O., Loeppen, S., Buchmann, A., andersson, P., Ittrich, C., Poellinger, L. and Schwarz, M. (2004). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 64, 4707–4710.
- 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.
- Mulero-Navarro, S. and Fernandez-Salguero, P.M. (2016). New trends in aryl hydrocarbon receptor biology. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 45.

Nault, R., Forgacs, A.L., Dere, E. and Zacharewski, T.R. (2013). Comparisons of differential gene expression elicited by TCDD, PCB126, β 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, 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.

Nørregaard, R., Kwon, T.-H. and Frøkiær, J. (2015). Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Kidney Res. Clin. Pract.* 34, 194–200.

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.

O’donnell, E., Koch, D., Bisson, W., Jang, H. and Kolluri, S. (2014). The aryl hydrocarbon receptor mediates raloxifene-induced apoptosis in estrogen receptor-negative hepatoma and breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 5, e1038–e1038.

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.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., ... Platten, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203.

Opitz, C.A., Patterson, L.F.S., Mohapatra, S.R., Dewi, D.L., Sadik, A., Platten, M. and Trump, S. (2020). The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer. *Br. J. Cancer* 122, 30–44.

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.

- Peterson, P. (2015) Immuunsüsteem ja kasvaja, p. 249-253. *In* Uiho, R., Kisand, K., Peterson, P., Reimand, K. Immunoloogia, Õpik kõrgkoolidele. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.
- 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.
- Reisz-Porszasz, S., Probst, M.R., Fukunaga, B.N. and Hankinson, O. (1994). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol. Cell. Biol.* 14, 6075–6086.
- Roosalu, M. (2010). Kõhunääre, p. 118. *In* Roosalu, M., Inimese anatoomia, 2^{ne} ed., Koolibri, Tallinn.
- 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.
- Sarantis, P., Koustas, E., Papadimitropoulou, A., Papavassiliou, A.G. and Karamouzis, M.V. (2020). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World J. Gastrointest. Oncol.* 12, 173.
- Seidel, S.D., Winters, G.M., Rogers, W.J., Ziccardi, M.H., Li, V., Keser, B. and Denison, M.S. (2001). Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 187–196.
- 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.
- Simm, M., Roots, O. and Järv, L. (2015). Saasteainete uuring Läänemere kalas. Eesti Vabariik: TÜ Eesti Mereinstituut, <https://www.agri.ee/sites/default/files/content/uuringud/2015/uuring-2015-saasteained-kala.pdf>
- Sinclair, L.V., Neyens, D., Ramsay, G., Taylor, P.M. and Cantrell, D.A. (2018). Single cell analysis of kynurenine and System L amino acid transport in T cells. *Nat. Commun.* 9, 1–11.
- Smyth, M.J., Ngiew, S.F., Ribas, A. and Teng, M.W. (2016). Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 143.
- 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.
- Sordillo, P.P., Sordillo, L.A. and Helson, L. (2017). The kynurenine pathway: a primary resistance mechanism in patients with glioblastoma. *Anticancer Res.* 37, 2159–2171.
- 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.
- Tascilar, M., Skinner, H.G., Rosty, C., ... Goggins, M. (2001). The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7, 4115–4121.
- 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.
- Vareedayah, A.A., Alkaade, S. and Taylor, J.R. (2018). Pancreatic adenocarcinoma. *Mo. Med.* 115, 230.
- Vogel, C.F., Li, W., Sciullo, E., Newman, J., Hammock, B., Reader, J.R., Tuscano, J. and Matsumura, F. (2007). Pathogenesis of aryl hydrocarbon receptor-mediated development of

lymphoma is associated with increased cyclooxygenase-2 expression. *Am. J. Pathol.* 171, 1538–1548.

Wang, L., Xu, W., Ma, L., ... Luan, Y. (2017a). Detoxification of benzo [a] pyrene primarily depends on cytochrome P450, while bioactivation involves additional oxidoreductases including 5-lipoxygenase, cyclooxygenase, and aldo-keto reductase in the liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 31, e21902.

Wang, L., Tang, W., Yang, S., ... Hussain, S.P. (2020). NO•/RUNX3/kynurenine metabolic signaling enhances disease aggressiveness in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 146, 3160–3169.

Wang, L.-T., Chiou, S.-S., Chai, C.-Y., Hsi, E., Yokoyama, K.K., Wang, S.-N., Huang, S.-K. and Hsu, S.-H. (2017b). Intestine-specific homeobox gene ISX integrates IL6 signaling, tryptophan catabolism, and immune suppression. *Cancer Res.* 77, 4065–4077.

Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* 26, 19.

Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., Rannug, A. and Rannug, U. (2009). The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo [3, 2-b] carbazole is present in humans. *J. Biol. Chem.* 284, 2690–2696.

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- β 1. *Mol. Pharmacol.* 59, 716–724.

Yin, X.-F., Chen, J., Mao, W., Wang, Y.-H. and Chen, M.-H. (2013). Downregulation of aryl hydrocarbon receptor expression decreases gastric cancer cell growth and invasion. *Oncol. Rep.* 30, 364–370.

Zhu, P., Zhou, K., Lu, S., Bai, Y., Qi, R. and Zhang, S. (2020). Modulation of aryl hydrocarbon receptor inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by repressing COX2/PGE2/STAT3 axis. *J. Cell Commun. Signal.* 1–18.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. Addgene – <https://www.addgene.org/browse/sequence/251928/> (kasutatud 24.05.21)
2. CHOPCHOP – <https://chopchop.cbu.uib.no/> (kasutatud 24.05.21)
3. Clinical Trials –
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=BAY&cntry=&state=&city=&dist=>
(kasutatud 24.05.21)
4. Eesti Vähiliit – <https://cancer.ee/statistika-2/> (kasutatud 24.05.21)
5. Ensembl –
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000106546;r=7:16916359-17346152 (kasutatud 24.05.21)
6. Human Protein Atlas – <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106546-AHR/tissue>
(kasutatud 24.05.21)
7. Johns Hopkins Medicine – Liver: Anatomy and Functions. (i.a). Kasutatud 24.05.21,
[https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-](https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions)
functions
8. NCBI – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/196> (kasutatud 24.05.21)
9. UniProt – <https://www.uniprot.org/uniprot/P35869> (kasutatud 24.05.21)

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'
IDO1_mRNA_F	5'-TCATCTCACAGACCACAAGTCA
IDO1_mRNA_R	5'-GCAAGACCTTACGGACATCTCC-3'
ISX_mRNA_F	5'-CAGGAAGGAAGGAAGAGCAA-3'
ISX_mRNA_R	5'-TGGGTAGTGGGTAAAGTGGAA-3'
PD-1_mRNA_F	5'-AGCTTCTCCAACACATCGGA-3'
PD-1_mRNA_R	5'-CTCTTTGATCTGCGCCTTGG-3'
PD-L1_mRNA_F	5'-TATGGTGGTGCCGACTACAA-3'
PD-L1_mRNA_R	5'-TGGCTCCCAGAATTACCAAG-3'
SLC36A4_mRNA_F	5'-CGCGAGGAGCTAGATATGGAT-3'
SLC36A4_mRNA_R	5'-TGGAAGTCCTAAAAGGCCAGT-3'
SLC7A8_mRNA_F	5'-TTGCCAATGTCGCTTATG TCA-3'
SLC7A8_mRNA_R	5'- AGAGACCCATTAACTCCTCCAAA-3'
TBP_mRNA_F	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'
TBP_mRNA_R	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'
TDO2_mRNA_F	5'-CAAATCCTCTGGGAGTTGGA-3'
TDO2_mRNA_R	5'-GTCCAAGGCTGTCATCGTCT-3'

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Pauliine Konsa,

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Arüülsüivesinike retseptori agonistide ja antagonistide mõju inimese pankreasejuha adenokartsinoomi rakkude geeniekspressioonile“,

mille juhendaja on Indrek Teino ja Antti Matvere,

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

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 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

Pauliine Konsa

31.05.2021