

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА**

На IX редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Биолошког факултета, одржаној 10.07.2019. године, на основу молбе ментора, др Мелите Видаковић, научног саветника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду и др Александре Ускоковић, вишег научног сарадника, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Ање З. Толић, истраживача сарадника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ под насловом: „Функционална анализа интеракција ТЕТ-посредоване оксидације 5-метилцитозина и PARP-зависне ADP-рибозилације у процесу деметилације ДНК“, у саставу:

др Мелита Видаковић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

др Александра Ускоковић, виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **Општи подаци о докторској дисертацији**

Докторска дисертација Ање З. Толић под насловом: „Функционална анализа интеракција ТЕТ-посредоване оксидације 5-метилцитозина и PARP-зависне ADP-рибозилације у процесу деметилације ДНК“ написана је на 127 страна и садржи 1 табелу, 36 слика и 222 библиографске јединице. Докторску дисертацију чине: Насловна страна на српском и енглеском језику, Подаци о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Листа скраћеница, Садржај, Текст по

поглављима и Прилози (Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу). Дисертација је подељена на 7 поглавља: Увод (1-27 стране), Циљеви (28-30 стране), Материјал и методе (31-51 стране), Резултати (52-84 стране), Дискусија (85-103 стране), Закључци (104 страна) и Литература (105-127 стране).

## **Анализа докторске дисертације**

У поглављу **УВОД** кандидаткиња је кроз пет одељака систематично дала преглед литературних података који описују досадашња сазнања релевантна за предмет истраживања своје докторске дисертације. У одељку под насловом **Метилација ДНК** описана је ова епигенетичка модификација и њена распрострањеност код кичмењака са посебним освртом на CpG острвца, регионе богате потенцијалним местима метилације ДНК, као и на ензиме ДНК метилтрансферазе који успостављају и одржавају обрасце метилације ДНК. У наредном одељку, насловљеном **Деметилација ДНК**, уведен је појам активне деметилације ДНК и дати су примери и предложени механизми овог процеса. У трећем одељку под насловом **ТЕТ протеини и механизми активне деметилације ДНК** дат је преглед различитих путева деметилације ДНК који укључују протеине ТЕТ фамилије а наведени су и кључни примери који указују на значај ТЕТ протеина и деметилације ДНК у развићу и патолошким стањима. Такође, у овом поглављу је описана структура и начин функционисања ТЕТ протеина са посебним освртом на различите начине регулације њихове активности путем одређених једињења или бројних посттранслационих модификација. С обзиром да формирање poli-ADP riboznih (PAR) полимера (PARилација) представља једну од установљених посттранслационих модификација ТЕТ протеина, следећи одељак, **PARP протеини и PARилација** описује PARP ензиме и њихово функционисање као и специфичности PAR полимера. Истакнуте су и бројне улоге које PARP-1 и PARилација остварују у ћелији са посебним освртом на регулацију (де)метилације ДНК. Завршни одељак, **Ген за CXCL12: пример за потенцијалну регулацију експресије путем деметилације ДНК**, концизно описује регулацију експресије гена за CXCL12 која укључује (де)метилацију ДНК као и регулацију од стране PARP-1. У оквиру овог одељка истакнута је улога CXCL12 у бројним

обољењима, међу којима су дијабетес и малигне трансформације, што указује на значај расветљавања механизма регулације експресије *Cxcl12* гена.

У поглављу **ЦИЉЕВИ** јасно и концизно су изнети циљеви ове докторске дисертације. Као општи циљ задато је да се испита функционална веза ТЕТ протеина и PARP-посредоване PARilације у процесу деметилације ДНК како на глобалном нивоу тако и локално, на примеру гена за хемокин CXCL12. Како би се реализовао општи циљ постављена су четири посебна циља: 1) да се испитају међусобне интеракције ТЕТ1 са PARP-1 ензимом и PAR полимерима; 2) да се установи утицај активности PARP-1 на ТЕТ1 у процесу оксидације 5-метилцитозина (5mC) до 5-хидроксиметилцитозина (5hmC) (хидроксиметилација) током деметилације ДНК; 3) да се испита утицај PARP-1 и PARilације на (де)метилацију и хидроксиметилацију ДНК, на глобалном нивоу; 4) да се испита функционални значај локалних ефеката интеракције ТЕТ ензима са PARP-1 на примеру *Cxcl12* гена.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно су описане све експерименталне методе као и начин обраде резултата, а наведени су и реагенси и уређаји који су коришћени у раду. У оквиру ове тезе примењени су *in vitro* и *in cellulo* експериментални приступи. За *in vitro* експерименте пречишћени су рекомбинантни каталитички домени мишјих ТЕТ1 и ТЕТ2 протеина и рекомбинантни мишји PARP-1 протеина а коришћен је и рекомбинантни хумани PARP-1. Ови протеини коришћени су у анализи *in vitro* PARilације ТЕТ1, dot-blot анализи нековалентне интеракције ТЕТ1 и PAR полимера као и у есеју за анализу кинетике активности ТЕТ протеина. У *in cellulo* експериментима коришћене су ћелијске линије мишјих ембрионалних фибробласта NIH3T3 и ембрионалних фибробласта изолованих из мишева којима је искључен ген за PARP-1 (PARP-/-). Имуноцитохемијско бојење коришћено је за анализу колокализације протеина, као и за анализу имунобојења HALO препарата и одређвање нивоа 5hmC. Осим тога, коришћене су и технике манипулације протеинским узорцима за имуноблот анализу, детекцију ко-имунопреципитације и анализу PARP активности. Експерименталне методе су обухватале и технике за манипулацију нуклеинским киселинама као што су квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (RT-qPCR), методе за анализу метилације ДНК базиране на PCR техници (MSP и HRM), имунопреципитација хроматина и 5mC ELISA есеј.

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ** јасно и прегледно су наведени добијени експериментални резултати. У складу са постављеним циљевима, резултати су приказани у оквиру три одељка. У оквиру одељка **Међусобна повезаност TET1 и PARP-1 протеина и утицај на активност TET1** показано је да TET1 и PARP-1 колокализују и интерагују у NIH3T3 ћелијама, као и да, у *in vitro* експериментима, долази до PARilације TET1 и његове нековалентне интеракције са PAR полимерима. Осим тога, показан је негативан утицај PARP-1-зависне PARilације на кинетику активности TET1 протеина *in vitro*. У одељку **Улога PARP-1 и PARilације у процесима (де)метилације ДНК на глобалном нивоу** показано је да у одсуству PARP-1 долази до пораста експресије *Tet1* и *Tet2* гена док се експресија *Dnmt* гена значајно не мења. Додатно је истакнута да у одсуству PARP-1 као и у условима инхибиције PARilације долази до пада у глобалном нивоу метилације ДНК и пораста у глобалном нивоу хидроксиметилације ДНК. У последњем одељку под називом **Функционална анализа локалних ефеката интеракције TET-PARP протеина на примеру *Cxcl12* гена**, прво је приказана повећана експресија *Cxcl12* гена и смањен ниво метилације промотора овог гена у одсуству PARP-1, а затим је истакнут утицај активације и инхибиције TET активности на експресију *Cxcl12* такође у одсуству PARP-1. Осим тога, показано је и присуство TET1 и TET2 на промотору *Cxcl12* уз повећано регрутовање TET2 на промоторски регион овог гена у одсуству PARP-1. На крају овог одељка показано је да и TET2 интерагује са PARP-1 *in cellulo* као и да подлеже PARilацији од стране PARP-1 *in vitro*.

Поглавље **ДИСКУСИЈА** подељено је на пет логичних целина у оквиру којих су поступно тумачени резултати ове докторске дисертације у контексту постојећих литературних података. У дискусији долази до изражаја аналитички приступ и критички став кандидаткиње у тумачењу сопствених резултата и доступних литературних података. У оквиру овог поглавља кандидаткиња детаљно дискутује добијене резултате у светлу релевантних истраживања о интеракцији TET протеина са PARP-1 и PAR полимерима, са посебним освртом на значајне и у извесној мери контрадикторне подаци о утицају PARilације на активност TET1 и глобални ниво метилације и хидроксиметилације. Такође, детаљно су протумачени резултати који указују на функционални значај повезаности TET и PARP протеина у регулацији експресије *Cxcl12* гена, са посебно значајним освртом на повезаност TET2 и PARP-1 протеина која до сада није детаљно испитивана. У оквиру

финалног одељка истакнуте су смернице за будућа истраживања које произилазе из ове тезе и најновијих података из научне литературе.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** сумирани су и јасно наведени закључци изведени на основу добијених и дискутованих резултата а према претходно постављеним конкретним циљевима. Истакнута су четири главна закључка: 1) ТЕТ протеини ступају у интеракцију са PARP-1 и PAR полимерима *in vitro* и *in cellulo*; 2) PARP-1-зависна PARilација негативно утиче на кинетику ТЕТ1 активности *in vitro*, која се огледа у његовој способности да оксидује 5mC до 5hmC; 3) PARP-1 и PARilација негативно утичу на ТЕТ-посредовану деметилацију на глобалном нивоу; 4) Међусобна повезаност ТЕТ и PARP-1 протеина има функционални значај за епигенетичку регулацију експресије *Cxcl12* путем (де)метилације ДНК.

На крају ове докторске дисертације налази се поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата опсежна листа библиографских јединица.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Tolić, A.**, Grdović, N., Dinić, S., Rajić, J., Đorđević, M., Sinadinović, M., Arambašić Jovanović, J., Mihailović, M., Poznanović, G., Uskoković, A., Vidaković, M., 2019. Absence of PARP-1 affects Cxcl12 expression by increasing DNA demethylation. *J. Cell. Mol. Med.* 23, 2610–2618. (M21)  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcmm.14154>
2. **Tolic, A.**, Rajic, J., Sinadinovic, M., Djordjevic, M., Dinic, S., Grdovic, N., Arambasic-Jovanovic, J., Mihailovic, M., Poznanovic, G., Jurkowski, T., Vidakovic, M., Uskokovic, A., 2019. Enrichment of Cxcl12 promoter with TET2: A possible link between promoter demethylation and enhanced gene expression in the absence of PARP-1. *Arch. Biol. Sci.* 3, 27–27. (M23)  
<https://doi.org/10.2298/ABS190404027T>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Tolic, A.**, Uskokovic, A., Dinic, S., Grdovic, N., Mihailovic, M., Arambasic Jovanovic, J., M., Djordjevic, Rajic, J., Sinadinovic, M., Vidakovic, M., Regulation of Cxcl12 gene transcription by DNA methylation, EMBO Conference: Chromatin and Epigenetics, EMBO Conference: Chromatin and Epigenetics, pp. 318 - 318, Heidelberg, Germany, 6.-10. May, 2015. (M34)

### **Провера оригиналности докторске дисертације**

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Функционална анализа интеракција ТЕТ-посредоване оксидације 5-метилцитозина и PARP-зависне ADP-рибозилације у процесу деметилације ДНК“, аутора Ање З. Толић, констатовано је да утврђено подударане текста износи 7%. Овај степен подударности последица је општих места и појмова, претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, личних имена и назива институција а уочена је и подударност стандардних назива протеина и реагенаса, скраћеница као и састава одређених пуфера. Све поменуто је у складу са чланом 9. Правилника и сматра се да докторска дисертација кандидаткиње Ање З. Толић представља оригинално научно дело.

### **Мишљење и предлог Комисије**

Докторска дисертација под насловом „Функционална анализа интеракција ТЕТ-посредоване оксидације 5-метилцитозина и PARP-зависне ADP-рибозилације у процесу деметилације ДНК“ представља оригиналан научни рад кандидаткиње Ање З. Толић и написана је систематично и јасно, са добро дефинисаним циљевима. Резултати приказани у оквиру ове дисертације представљају значајан допринос разумевању механизма регулације процеса ТЕТ-посредоване деметилације ДНК и то путем PARP-зависне PARилације. Деметилација ДНК представља један од основних процеса у ћелији и налази се у основи бројних физиолошких и патолошких стања и зато је расветљавање механизма регулације овог процеса важно за будућу примену стечених сазнања у медицини. Кандидаткиња је показала добро познавање литературе и проблематике релевантне научне области као и висок степен истраживачке зрелости.

Остварени резултати објављени су у оквиру два оригинална научна рада, што потврђује актуелност и значајност добијених резултата.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације Ање З. Толић, под насловом „Функционална анализа интеракција TET-посредоване оксидације 5-метилцитозина и PARP-зависне ADP-рибозилације у процесу деметилације ДНК“, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри јавну усмену одбрану докторске дисертације кандидаткиње Ање З. Толић.

**КОМИСИЈА:**

---

др Мелита Видаковић, научни саветник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“  
Универзитет у Београду

---

др Александра Ускоковић, виши научни сарадник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“  
Универзитет у Београду

---

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор  
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

У Београду, 18.07.2019. године