

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Anja Z. Tolić

**FUNKCIONALNA ANALIZA INTERAKCIJA
TET-POSREDOVANE OKSIDACIJE
5-METILCITOZINA I PARP-ZAVISNE
ADP-RIBOZILACIJE U PROCESU DEMETILACIJE
DNK**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Anja Z. Tolić

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF INTERACTIONS
BETWEEN TET-MEDIATED OXIDATION OF
5-METHYLCYTOSINE AND PARP-DEPENDENT
ADP-RIBOSYLATION IN THE PROCESS OF DNA
DEMETHYLATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI

dr Aleksandra Uskoković, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Melita Vidaković, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Aleksandra Uskoković, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Melita Vidaković, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,
Univerzitet u Beogradu

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta “Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu”; potprojekat “Genetska predispozicija za razvoj dijabetesa tip 1 i novi pristupi u prevenciji disfunkcije beta-ćelija u dijabetesu: izučavanje puteva prenosa signala posredovanih CXCL12” (OI173020), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

ZAHVALNICA

Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Aleksandri Uskoković za sav uloženi trud, savete i strpljenje pokazano tokom izrade ove teze. Hvala za neprekidnu podršku i optimizam i što je verovala u mene čak i kada sam ja sumnjala. Zahvalna sam joj što je uvek bila otvorena za razgovor i uvažavala moje ideje čime mi je omogućila da se razvijam kao samostalni istraživač a da pored toga uvek znam da imam na koga da se oslonim.

Veliku zahvalnost dugujem dr Meliti Vidaković zato što je uvek imala puno razumevanja i vremena za mene. Njena posvećenost i entuzijizam su me od prvog dana motivisali da napredujem i ne odustajem kada naiđem na prepreke. Veliko hvala što je sa mnom nesebično delila svoje znanje i što mi je svojim zalaganjem obezbedila brojne prilike za usavršavanje ne samo u zemlji već i u inostranstvu.

Zahvaljujem se dr Dušanki Savić-Pavićević na podršci, savetima i ukazanoj pažnji od početka osnovnih sve do kraja doktorskih studija.

Veliko hvala dr Svetlani Dinić, dr Neveni Grdović, dr Mirjani Mihailović i dr Jeleni Arambašić Jovanović za pomoć pri izvođenju brojnih eksperimenata, sve diskusije, brojne savete i veliko strpljenje. Hvala im što su me bezrezervno prihvatile kao člana tima i što su mi pružale podršku kada god mi je bila potrebna. Posebno se zahvaljujem dr Neveni Grdović za druženje tokom dugih šetnji po beogradskim ulicama, bez obzira na vremenske uslove. Tatjani Milićević hvala na svojoj pomoći koja je omogućila da se ova teza lakše i brže realizuje.

Dr Ilijani Grigorov, dr Svetlani Ivanović-Matić, dr Desanki Bogojević i dr Vesni Martinović hvala na lepoj saradnji u laboratoriji.

Dr Goranu Poznanoviću veliko hvala na korisnim diskusijama i konstruktivnim savetima tokom pisanja radova i ove teze.

Milošu, Jovani i Mariji dugujem ogromnu zahvalnost jer su mi pomagali kad god mi je to bilo neophodno i jer su uvek tu da sa mnom podele sve dobre i loše trenutke, da me

strpljivo saslušaju, razumeju, razvesele i motivišu. Bez njihove podrške ceo ovaj poduhvat bi mi bio nezamislivo teži.

Anji, Sofiji i Jeleni hvala za iskrene savete, druženje i prijateljsku atmosferu u našoj laboratoriji.

Dr Tomaszu Jurkowskom veliko hvala što mi je pružio priliku da od njega učim i da deo eksperimenata za ovu doktorsku disertaciju uradim u njegovoj laboratoriji. Hvala i što je učinio da se osećam kao deo tima.

Hvala Mirunalini, Piteru, Goranu, Raluki i Raduu za nesebičnu pomoć, ogromno strpljenje, puno smeha i što su učinili da se u Štutgartu osećam kao kod kuće.

Hvala dr Nataši Nestorović za izdvojeno vreme, izuzetno korisne savete i nesebičnu pomoć u eksperimentima za koje je korišćen konfokalni mikroskop. Njen entuzijazam i analitički pristup inspirisali su me da se i sama dodatno zainteresujem za ovu metodologiju.

Veliko hvala mojoj profesorki Sunčici Dušmanović koja je za mene predstavljala važan uzor, koja me je uvela u svet laboratorijskih eksperimenata i pomogla mi da tu načinim svoje prve korake.

Drugarima Sonji, Stefanu, Nini, Branku, Igoru, Andreji, Filipu, Emi, Hristini, Ani, Jeleni, Ivanu i Milici hvala što su uvek uz mene ma gde se fizički nalazili.

Mom Ivanu veliko hvala što me uvek podstiče da sagledam stvari iz drugačijeg ugla, da se trudim i da ne odustajem u teškim momentima.

Mojoj celoj porodici a posebno mojim roditeljima hvala na strpljenju, brižnosti i bezuslovnoj podršci.

Funkcionalna analiza interakcija TET-posredovane oksidacije 5-metilcitozina i PARP-zavisne ADP-ribozilacije u procesu demetilacije DNK

Sažetak

Važan aspekt u rasvetljavanju procesa demetilacije DNK predstavlja identifikacija faktora koji regulišu aktivnost TET proteina. Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita funkcionalna veza između TET-posredovane oksidacije 5mC i PARP-zavisne PARilacije u procesu demetilacije DNK, na globalnom i lokalnom nivou. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da PARP-1 interaguje sa TET1 i TET2. Pokazano je i da oba proteina podležu *in vitro* PARilaciji. PARP-1-zavisna PARilacija TET1 proteina negativno utiče na kinetiku aktivnosti TET1 *in vitro*. Rezultati *in cellulo* eksperimenata pokazali su da u odsustvu PARP-1 dolazi do porasta ekspresije *Tet1* i *Tet2*, a da prilikom inhibicije PARilacije i u odsustvu PARP-1 dolazi do pada globalnog nivoa metilacije i porasta hidroksimetilacije DNK. Za analizu lokalnih efekata TET-PARP interakcije izabran je gen za hemokin CXCL12 koji učestvuje u brojnim fiziološkim i patološkim procesima pa je ispitivanje regulacije njegove ekspresije važno za buduće terapijske pristupe. Pokazano je da u odsustvu PARP-1 dolazi do povećane ekspresije kao i do pada u metilaciji *Cxcl12*. Nakon tretmana aktivatorom/inhibitorom TET aktivnosti, u odsustvu PARP-1, ekspresija *Cxcl12* je povećana/smanjena. Prisustvo TET1 i TET2 detektovano je na promotoru *Cxcl12* uz povećano regrutovanje TET2 u odsustvu PARP-1.

U ovoj disertaciji pokazan je inhibitorski uticaj PARP-1 i PARilacije na aktivnost TET enzima u procesu demetilacije DNK na globalnom nivou, a funkcionalnost lokalnih efekata povezanosti TET i PARP enzima u procesu (de)metilacije ustanovljena je na primeru *Cxcl12*. Demetilacija DNK nalazi se u osnovi brojnih fizioloških i patoloških stanja, zato rasvetljavanje mehanizama regulacije ovog procesa predstavlja važan korak u potencijalnoj primeni stečenih saznanja u medicini.

Ključne reči: TET1, TET2, PARP-1, PAR polimeri, PARilacija, metilacija DNK, demetilacija DNK, *Cxcl12* gen

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Functional analysis of interactions between TET-mediated oxidation of 5-methylcytosine and PARP-dependent ADP-ribosylation in the process of DNA demethylation

Abstract

Identification of factors that regulate the activity of TET proteins is important for elucidating the process of DNA demethylation. The aim of this doctoral dissertation was to investigate the functional relationship between TET-mediated oxidation of 5mC and PARP-dependent PARylation in the process of DNA demethylation at both global and local levels. This thesis shows that PARP-1 interacts with TET1 and TET2, and that both TET proteins can undergo *in vitro* PARylation. PARP-1-dependent PARylation of TET1 negatively affected the kinetics of TET1 activity *in vitro*. The results of *in cellulo* experiments revealed that the expression of *Tet1* and *Tet2* increased in the absence of PARP-1, whereas when PARylation was inhibited or in the absence of PARP-1, there was a decrease in the global level of DNA methylation and an increase in DNA hydroxymethylation. The *Cxcl12* gene was selected for the analysis of the local effects of TET-PARP interaction since chemokine CXCL12 participates in numerous physiological and pathological processes, and exploring the regulation of expression of this gene is important for potential clinical intervention. Increased expression and decreased methylation of *Cxcl12* were observed in the absence of PARP-1. After treatment with an activator or inhibitor of TET activity in the absence of PARP-1, *Cxcl12* expression was respectively increased or decreased. The presence of TET1 and TET2 was detected on the *Cxcl12* promoter, with enhanced recruitment of TET2 in the absence of PARP-1.

This dissertation describes the inhibitory effects of PARP-1 and PARylation on the activity of TET enzymes in the process of DNA demethylation at the global level, and the local effects of TET-PARP interplay on DNA (de)methylation of *Cxcl12* gene. DNA demethylation is at the root of numerous physiological and pathological conditions, and elucidating the mechanisms that regulate this process is an important step in the potential application of acquired knowledge in medicine.

Key words: TET1, TET2, PARP-1, PAR polymers, PARylation, DNA methylation, DNA demethylation, *Cxcl12* gene

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

Lista skraćenica:

3AB – 3-aminobenzamid

5aza – 5-azacitidin (eng. *5-azacytidine*)

5caC – 5-karboksilcitozin

5fC – 5-formilcitozin

5hmC – 5-hidroksimetilcitozin

5hmU – 5-hidroksimetiluracil

5mC – 5-metilcitozin

5mdCTP – metilovani dezoksicitidin trifosfat

AD – domen za automodifikacije (eng. *automodification domain*)

AID – eng. *activation-induced cytidine deaminase*

APOBEC – eng. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme*

ART – subdomen ADP-ribozil transferaza

BER – bazna ekscizionna reparacija (eng. *base excision repair*)

BRCT – eng. *breast cancer associated 1 C-terminus*

BSA – goveđi serum albumin (eng. *bovine serum albumine*)

C – citozin

CAT – katalitički domen (eng. *catalytic domain*)

ChIP – imunoprecipitacija hromatina (eng. *chromatin immunoprecipitation*)

CpG – citozin-guanin

CXXC – cistein-X-X-cistein domen cinkanih prstiju

Cys – cistein (eng. *cysteine*)

dCTP – dezoksicitidin trifosfat

DMEM – modifikovan Dubelko medijumu (eng. *Dubelco's Modified Eagle Medium*)

DMOG – dimetil oksalilglicin

DMSO – dimetil sulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DNKaza – dezoksiribonukleaza

DNMT – DNK metiltransferaza (eng. *DNA methyltransferase*)

DSB – dvolančani prekid (eng. *double-strand break*)

DSBH – dvolančani β heliks domen (eng. *double-stranded β helix domain*)

ECL – eng. *enhanced chemiluminescence solution*

ELISA – eng. *enzyme linked immunosorbent assay*

FBS – fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*)

FDA – uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Ameriĉkih DrŹava (eng. *Food and Drug Administration*)

G – guanin

HD – subdomen bogat zavojnicam (eng. *helical subdomain*)

HRM – analiza krive topljenja visoke rezolucije (eng. *high resolution melting analysis*)

HRP – peroksidaza rena (eng. *horseradish peroxidase*)

MSP – metilaciono specifiĉan PCR (eng. *methylation specific PCR*)

MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid

NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid

O-GlcNAc – eng. *O-linked N-acetylglucosamine*

PAA – poliakrilamid

PAGE – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis*)

PAR – poli-ADP-riboza

PARG – poli(ADP-ribozil) glikohidrolaza (eng. *poly(ADP-ribose) glycohydrolase*)

PARilacija – poli-ADP-ribozilacija

PARP – eng. *poly(ADP-ribose) polymerase*

PBM – PAR-vezujuĉi motivi (eng. *PAR-binding motifs*)

PBS – eng. *phosphate-buffered saline*

PBST – eng. *phosphate-buffered saline with Tween*

PCR – lanĉana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*)

PFA – paraformaldehidom

PGC – primordijalne germinativne ĉelije (eng. *primordial germinative cells*)

PVDF – polivinildifluorid

RNK – ribonukleinska kiselina

RT-qPCR – kvantitativna lanĉana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. *real-time quantitative polymerase chain reaction*)

SBB – jednolančani prekid (eng. *single-strand break*)

SDS – natrijumdodecilsulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*)

SMUG1 – eng. *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase*

T – timin

TCA – trihlorsirćetne kiseline (eng. *trichloroacetic acid*)

TDG – timin-DNK glikozilaza (eng. *thymine DNA glycosylase*)

TET – eng. *ten-eleven translocation*

TSS – mesto početka transkripcije (eng. *transcription start site*)

TTBS – eng. *tris-tween-buffered saline*

VitC – vitamin C

WGR – domen bogat triptofanom, glicinom i argininom

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Metilacija DNK	1
1.1.1. CpG ostrvca.....	1
1.1.2. DNK metiltransferaze.....	3
1.2. Demetilacija DNK	4
1.3. TET proteini i mehanizmi aktivne demetilacije DNK	5
1.3.1. Primeri TET-posredovane aktivne demetilacije DNK.....	8
1.3.1.1. TET proteini u reprogramiranju DNK metilacije tokom razvića	8
1.3.1.2. TET proteini i demetilacija DNK u patološkim stanjima	10
1.3.2. Struktura TET proteina.....	11
1.3.3. Regulacija aktivnosti TET proteina.....	13
1.3.3.1. Posttranslacione modifikacije TET proteina.....	14
1.4. PARP proteini i PARilacija.....	15
1.4.1. Struktura i aktivnost PARP-1 proteina	16
1.4.1.1. PARP inhibitori.....	17
1.4.2. PAR polimeri.....	18
1.4.3. Uloge PARP-1 proteina i PARilacije	22
1.5. Gen za CXCL12: primer za potencijalnu regulaciju ekspresije putem demetilacije DNK...25	
2. CILJEVI.....	28
3. MATERIJAL I METODE.....	31
3.1. In vitro metode.....	31
3.1.1. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantnih proteina	31
3.1.2. In vitro PARilacija TET proteina	32
3.1.3. Dot-blot analiza nekovalentne interakcije TET1 proteina i slobodnih PAR polimera	33
3.1.4. Esej za analizu kinetike aktivnosti TET proteina	33
3.2. Čelijska kultura.....	35
3.2.1. Tretmani ćelija.....	35
3.2.2. Test vijabilnosti ćelija.....	36
3.3. Imunocitohemija	36

3.3.1. Ispitivanje kolokalizacije proteina imunocitohemijskim bojenjem	37
3.3.2. Priprema jedarnih HALO preparata i imunobojenje.....	38
3.3.3. Određivanje nivoa 5hmC imunocitohemijskim bojenjem	39
3.4. Tehnike za manipulaciju proteinskim uzorcima.....	41
3.4.1. Izolacija ćelijskih lizata	41
3.4.2. Taloženje proteina trihlorsirćetnom kiselinom	41
3.4.3. Određivanje koncentracije proteina.....	41
3.4.4. Elektroforetsko razdvajanje proteina.....	42
3.4.4.1. <i>Tris-glicinska elektroforeza</i>	42
3.4.4.2. <i>Tris-tricinska elektroforeza</i>	42
3.4.5. Imunoblot analiza	43
3.4.6. Ko-immunoprecipitacija.....	43
3.4.7. Esej PARP aktivnosti	44
3.5. Tehnike za manipulaciju nukleinskim kiselinama.....	45
3.5.1. Izolacija genomske DNK	45
3.5.2. Izolacija totalne RNK.....	45
3.5.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu	46
3.5.4. Metode za analizu metilacije DNK bazirane na PCR tehnici – MSP i HRM.....	47
3.5.4.1. <i>Bisulfitna konverzija DNK</i>	47
3.5.4.2. <i>Dizajniranje prajmera specifičnih za bisulfitno konvertovanu DNK</i>	47
3.5.4.3. <i>MSP i HRM reakcije i analiza podataka</i>	48
3.5.5. Imunoprecipitacija hromatina.....	49
3.5.6. 5mC ELISA esej.....	51
4. REZULTATI.....	52
4.1. Međusobna povezanost TET1 i PARP-1 proteina i uticaj na aktivnost TET1.....	52
4.1.1. Kolokalizacija TET1 i PARP-1 proteina <i>in cellulo</i>	52
4.1.2. Interakcija TET1 i PARP-1 proteina <i>in cellulo</i>	54
4.1.3. PARilacija TET1 od strane PARP-1 proteina <i>in vitro</i>	54
4.1.4. Nekovalentna interakcija TET1 proteina i slobodnih PAR polimera <i>in vitro</i>	57
4.1.5. Uticaj PARP-1-zavisne PARilacije na kinetiku aktivnosti TET1 proteina <i>in vitro</i>	58
4.2. Uloga PARP-1 i PARilacije u procesima (de)metilacije DNK na globalnom nivou	61
4.2.1. PARP-1 i PARilacija	61
4.2.2. Uticaj PARP-1 na ekspresiju gena za proteine uključene u procese (de)metilacije DNK..	62
4.2.3. Hidroksimetilacija DNK u odsustvu PARP-1	62
4.2.4. Inhibicija PARilacije niraparibom.....	63

4.2.5. Uticaj inhibicije PARilacije na (de)metilaciju DNK na globalnom nivou	65
4.2.6. Uticaj inhibicije PARilacije na hidrosimetilaciju DNK.....	66
4.3. Funkcionalna analiza lokalnih efekata interakcije TET-PARP proteina na primeru <i>Cxcl12</i> gena	69
4.3.1. Ekspresija <i>Cxcl12</i> u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama	69
4.3.2. Uticaj demetilacije na ekspresiju <i>Cxcl12</i> gena	70
4.3.3. Metilacioni profil <i>Cxcl12</i> gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama	71
4.3.4. Uticaj TET aktivnosti na ekspresiju <i>Cxcl12</i> gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama	75
4.3.5. Prisustvo TET proteina na promotoru <i>Cxcl12</i> gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama.....	77
4.3.6. Međusobna povezanost TET2 i PARP-1 proteina: međuproteinske interakcije i PARilacija TET2 od strane PARP-1 proteina.....	80
5. DISKUSIJA	85
5.1. Interakcija TET proteina sa PARP-1 i PAR polimerima.....	85
5.2. Uticaj PARilacije na aktivnost TET1.....	89
5.3. Globalni uticaj PARP-1 i PARilacije na TET-posredovanu demetilaciju DNK	90
5.3.1. PARP-1 i ekspresija ključnih enzima u procesima (de)metilacije DNK	90
5.3.2. Uticaj PARP-1 i PARilacije na globalni nivo metilacije i hidrosimetilacije DNK.....	92
5.4. Funkcionalna povezanost TET i PARP proteina u regulaciji ekspresije <i>Cxcl12</i> gena.....	97
5.5. Smernice za buduća istraživanja	101
6. ZAKLJUČCI.....	104
7. LITERATURA	105

1. UVOD

1.1. Metilacija DNK

Metilacija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) predstavlja jednu od najviše ispitivanih epigenetičkih modifikacija, široko rasprostranjenu u svim domenima živog sveta. Kod eukariota, metilacija DNK podrazumeva formiranje 5-metilcitozina (5mC) kovalentnim dodavanjem metil grupe na peti ugljenikov atom pirimidinskog prstena citozina (C). Kod sisara, do metilacije C najčešće dolazi u okviru citozin-guanin (CpG) dinukleotida i procenjuje se da je 70%-80% CpG dinukleotida metilovano duž celog genoma (Law i Jacobsen, 2010) od kojih se preko 90% nalazi u okviru ponovljenih DNK sekvenci konstitutivnog heterohromatina (Beisel i Paro, 2011). Do metilacije može doći i kod C praćenog drugim nukleotidima ali je ovaj vid metilacije znatno manje rasprostranjen kod sisara (Jang i sar., 2017). Za sada se pretpostavlja da metilacija C van CpG konteksta može imati ulogu u pluripotentnosti stem ćelija a javlja se u većoj meri i kod neurona mada je kod drugih diferenciranih tipova ćelija ovaj vid metilacije C vrlo retko prisutan (Jang i sar., 2017; Lister i sar., 2013, 2009).

1.1.1. CpG ostrvca

Učestalost CpG dinukleotida kod kičmenjaka značajno je niža (oko 4 puta) nego što je očekivano na osnovu sadržaja C i guanina (G) u DNK (Bird, 1980; Jones, 2012; Swartz i sar., 1962). S obzirom da je poznato da može doći do spontane deaminacije 5mC do timina (T) (Duncan i Miller, 1980) pretpostavlja se da je metilacija DNK u germinativnim ćelijama uzrok gubitka, odnosno smanjenog sadržaja, CpG dinukleotida usled njihovog mutiranja u timin-guanin dinukleotide (Bird, 1980; Jones, 2012). Ipak, u genomu postoje specifični regioni DNK bogati CpG dinukleotidima koji se nazivaju CpG ostrvca. Smatra se da je veća učestalost CpG dinukleotida u CpG ostrvcima opstala usled odsustva metilacije ovih regiona u germinativnim ćelijama (Jones, 2012). Parametri koji se u bioinformatički koriste za identifikaciju CpG ostrvaca unutar određene sekvence su: ukupni sadržaj C i G (%C+G), odnos očekivane i detektovane količine CpG dinukleotida (eng. *observed-to-expected ratio*, obs/exp) i minimalna dužina ostrvca. Granične vrednosti ovih parametara su u izvesnoj meri arbitrarne i

variraju među različitim studijama i bioinformatičkim alatima, mada se najčešće podrazumeva da je %G+C preko 50% dok je obs/exp preko 0,6 dok minimalna dužina varira od 200-500 bp (Illingworth i Bird, 2009). Interesantno je da su uprkos visokom sadržaju potencijalnih mesta metilacije, odnosno CpG dinukleotida, CpG ostrvca u najvećoj meri nemetilovana čak i kod somatskih ćelija (Antequera, 2005; Bird i sar., 1985; Illingworth i Bird, 2009; Jones, 2012). Poznato je da se CpG ostrvca nalaze u blizini mesta početka transkripcije (eng. *transcription start site*, TSS) i da se preklapaju sa regionima promotora 60-70% humanih gena (Illingworth i Bird, 2009; Saxonov i sar., 2006). Osim toga, CpG ostrvca su prisutna u promotorima većine konstitutivnih gena dok se ređe javljaju kod promotora tkivno-specifično eksprimiranih gena (Illingworth i Bird, 2009; Zhu i sar., 2008).

Uprkos tome što većina CpG ostrvaca u okviru promotora zadržava nemetilovan status, postoje slučajevi u kojima dolazi do njihove metilacije koja korelira sa odsustvom ekspresije gena kontrolisanih od strane metilovanih promotora. Kod inaktivacije X hromozoma dolazi do utišavanja gena na X hromozomu koje je povezano sa metilacijom CpG ostrvaca u njihovim promotorima (Sharp i sar., 2011). Monoalelska ekspresija imprintovanih gena je takođe regulisana metilacijom CpG ostrvaca u promotoru utišanog alela (Antequera i Bird, 2018; Baylin, 2005; Yuen i sar., 2011). Poznato je i da je metilacija DNK važna za inaktivaciju transpozona širom genoma (Yoder i sar., 1997). Osim toga, pokazalo se da do metilacije CpG ostrvaca u promotorima autozomalnih gena dolazi kod pojave tumora kao i kod tkivno-specifično eksprimiranih gena kod gajenih ćelijskih linija (Antequera i Bird, 2018; Baylin, 2005). Kod malignih transformacija metilacija DNK učestvuje u transkripcionom utišavanju gena tumor-supresora dok inhibitor metilacije 5-azacitidin (eng. *5-azacytidine*, 5aza) može indukovati ekspresiju ovih aberantno utišanih gena (Baylin, 2005). Osim toga, u zdravim somatskim ćelijama, metilacija CpG ostrvaca u okviru promotora povezana sa utišavanjem ekspresije, ustanovljena je i kod nekih tkivno-sepcifičnih gena (Shen i sar., 2007) kao i kod gena koji su isključivo eksprimirani u germinativnim ćelijama (Weber i sar., 2007). Sveukupno navedeni primeri jasno ukazuju na inhibitornu ulogu koju metilacija CpG ostrvaca u okviru promotora ostvaruje na ekspresiju gena.

Iako je najviše pažnje posvećeno CpG ostrvcima koja se preklapaju sa promotorima gena, poznato je da se ona mogu naći i u okviru intra- i inter- genskih

sekvenci (Medvedeva i sar., 2010). Procenjuje se da je u ljudskom genomu oko 25-50% CpG ostrvaca pozicionirano u blizini 5' regiona gena dok se preostala ostrvca prostiru širom intra- i inter- genskih regiona preklapajući se u velikoj meri sa ponovljenim sekvencama ali i sa egzonima i intronima čak i u okviru 3' regiona gena (Medvedeva i sar., 2010). Dosadašnja istraživanja ukazala su na više potencijanih funkcija metilacije sekvenci van promotora gena. Smatra se da metilacija unutar tela gena ima ulogu u regulaciji upotrebe alternativnih promotora (Maunakea i sar., 2010) kao i u inaktivaciji transpozona (Yoder i sar., 1997). Pokazalo se i da metilacija prvog egzona takođe može biti značajna za represiju transkripcije (Brenet i sar., 2011) dok metilacioni status egzona, introna i egzon-intron granice može uticati na splajsovanje (Brenet i sar., 2011). Interesantno je da metilacija u okviru tela gena ne blokira elongaciju transkripcije već generalno pozitivno korelira sa ekspresijom gena (Jones, 2012).

1.1.2. DNK metiltransferaze

Metilovanje C obavljaju enzimi DNK metiltransferaze (eng. *DNA methyltransferase*, DNMT) koje su klasifikovane u dve grupe: *de novo* metiltransferaze - DNMT3a i DNMT3b, koje uspostavljaju obrazac metilacije (Okano i sar., 1999; Yokochi i Robertson, 2002) i metiltransferaza za održavanje - DNMT1, koja obnavlja predhodno uspostavljeni metilacioni obrazac nakon ćelijske deobe. Naime, prilikom ćelijske deobe dolazi do replikacije DNK tako što se postojeći lanci dvolančane zavojnice razdvajaju i služe kao osnova za sintezu novih njima komplementarnih lanaca, kako bi obe ćerke ćelije na kraju procesa deobe dobile istu DNK od ćelije od koje su nastale. Tokom procesa replikacije dolazi do nastanka hemimetilovanih pozicija jer stari lanac sadrži metilovane CpG dinukleotide dok se naspram njih u novom lancu nalazi tek ugrađeni nemetilovan C. Ovo hemimetilovano stanje prepoznaje DNMT1 uz pomoć partner proteina UHRF1 i zatim katalizuje metilaciju u okviru novog lanca obnavljajući na taj način metilacioni obrazac koji je postojao u ćeliji i pre deobe (Bostick i sar., 2007; Hermann i sar., 2004). Dodatna potvrda uloge DNMT1 u obnavljanju metilacionih obrazaca neposredno nakon replikacije je u tome što ovaj enzim poseduje domene koji interaguju sa klizećom klemom DNK polimeraze i omogućavaju pozicioniranje DNMT1 u okviru replikacione viljuške (Chuang i sar., 1997). Interesantno je da su neka istraživanja ukazala da uloge DNMT ezima nisu

obavezno potpuno jasno razgraničene, kao što se prvobitno smatralo, te da DNMT3a i 3b mogu učestvovati u održavanju obrasca metilacije (Chen i sar., 2003) dok DNMT1 ima sposobnost *de novo* metilacije *in vitro* (Christman i sar., 1995).

Izuzetan značaj metilacije DNK postaje jasan kada se razmotre posledice odsutva DNK metiltransferaza (Bochtler i sar., 2017). Odsustvo DNMT1 dovodi do smrti embriona miša (Bochtler i sar., 2017; Li i sar., 1992) kao i diferenciranih ćelija gajenih u kulturi (Bochtler i sar., 2017; Brown i Robertson, 2007). Druge dve metiltransferaze nisu neophodne za preživljavanje ćelija u kulturi ali delecija *Dnmt3b* takođe dovodi do smrti embriona miša dok odsustvo DNMT3a dovodi do smrti miševa nekoliko nedelja nakon rođenja (Bochtler i sar., 2017; Okano i sar., 1999). Sveukupno ovi podaci ukazuju na važnu ulogu koju metilacija ostvaruje u pravilnom prenatalnom razviću embriona.

1.2. Demetilacija DNK

Metilacija DNK prvi put je otkrivena pre više od sto godina i od tada su brojna istraživanja posvećena ovoj epigenetičkoj modifikaciji. Uprkos tome, mehanizam uklanjanja metilacije dugo je predstavljao nepoznanicu. Poznato je bilo jedino da do demetilacije može doći pasivno kada tokom sukcesivnih replikacija DNK i ćelijskih deoba nema obnavljanja metilacionog obrasca usled odsustva aktivnosti DNMT1 (Gehring i sar., 2009). Potraga za enzimima i mehanizmima aktivne demetilacije išla je u raznim pravcima ali dugo bez jasnog uspeha a rezultati su često bili kontradiktorni i nereproducibilni. Jedna od ideja bila je da se identifikuje enzim koji bi direktno uklanjao metil grupu sa 5mC ali ova reakcija nije termodinamički povoljna pa do sada nije pronađen odgovarajući enzim. Neki naučnici su zastupali ideju da je potraga za enzimima aktivne demetilacije neuspešna zato što kod sisara i ne dolazi do aktivnog uklanjanja metilacije (Ooi i Bestor, 2008). Smatralo se da metilacija DNK predstavlja vrlo postojanu epigenetičku modifikaciju važnu za dugoročno utišavanje imprintovanih gena, retrotranspozona i inaktivaciju X hromozoma te se pretpostavljalo da bi pasivna demetilacija mogla biti jedini neophodan mehanizam za uklanjanje ove modifikacije kod sisara. Ipak, postoje situacije u kojima je jasno da do demetilacije dolazi nezavisno od replikacije i glavni primer za to je brza globalna demetilacija DNK muškog pronukleusa nakon fertilizacije i formiranja zigota, što se ne može objasniti pasivnom

demetilacijom. Takođe, aktivna demetilacija, nezavisna od replikacije, može biti odgovorana za promene uzrokovane sredinskim uticajima i u visoko specijalizovanim ćelijama (Bhutani i sar., 2011) a takvi primeri su sve brojniji. Na primer, pokazano je da do demetilacije promotora gena za BDNF u postmitotskim neuronima dolazi nakon depolarizacije (Martinowich i sar., 2003). Zatim, ustanovljeno je da u ćelijama kancera dojke, gen za TFF1 prolazi kroz brze cikluse (u toku 20-40min) metilacije i demetilacije pod dejstvom estrogena (Kangaspeska i sar., 2008; Métivier i sar., 2008). Interesantan je i rad koji je pokazao da do demetilacije dolazi u skeletnim mišićima neposredno nakon akutnog vežbanja (Barrès i sar., 2012). Svi pomenuti primeri ukazuju na to da metilacija i demetilacija DNK mogu biti znatno dinamičniji mehanizmi nego što se do skoro mislilo pa samim tim postaje jasno da mehanizam aktivne demetilacije mora postojati.

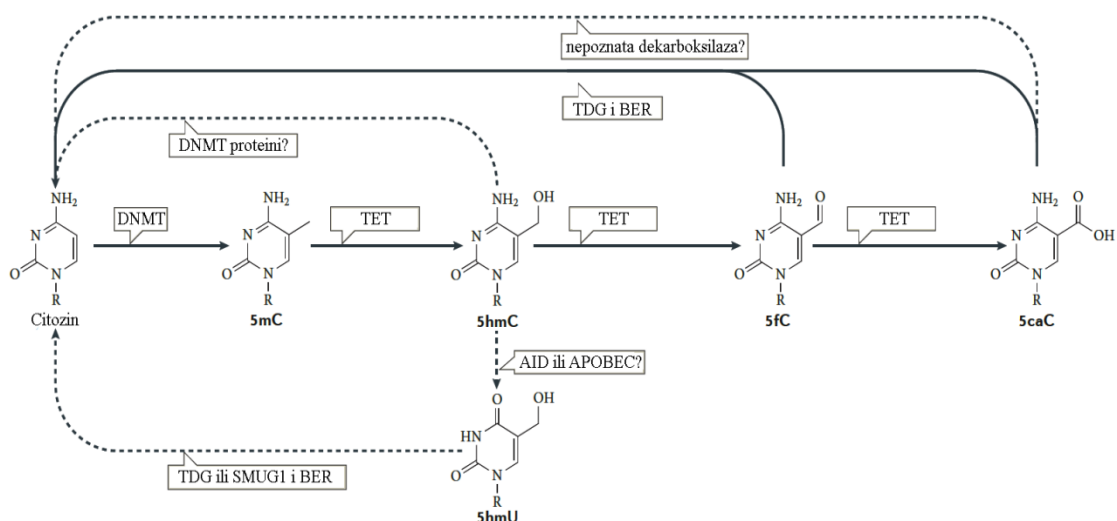
Jedan od predloženih mehanizama aktivne demetilacije podrazumeva deaminaciju 5mC u T praćenu baznom ekscizionom reparacijom (eng. *base excision repair*, BER). Pokazano je da AID (eng. *activation-induced cytidine deaminase*) i APOBEC (eng. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme*) proteini mogu sprovesti ovu reakciju ali su efikasni u tome jedino kada im je supstrat jednolančana DNK a takođe imaju znatno viši afinitet prema nemodifikovanom C nego prema 5mC (Wu i Zhang, 2014), tako da nije poznato koliko je i da li je uopšte ovaj put aktivne demetilacije zastupljen. Zanimljiv je i rad u kom je pokazano da same metiltransferaze DNMT1, DNMT3a i DNMT3b pod određenim uslovima imaju sposobnost deaminacije 5mC *in vitro* (Chen i sar., 2013) mada se ne zna da li bi se isto moglo pokazati *in vivo*.

1.3. TET proteini i mehanizmi aktivne demetilacije DNK

Ubedljivo najveći pomak u istraživanjima demetilacije DNK načinjen je kada je otkriveno učešće TET (eng. *ten-eleven translocation*) familije enzima u ovom procesu (Iyer i sar., 2009; Tahiliani i sar., 2009). Ova familija sastoji se od tri enzima TET1, TET2 i TET3, i svi imaju sposobnost da putem oksidacije prevedu 5mC u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC) (Iyer i sar., 2009; Tahiliani i sar., 2009). Šta više, ustanovljeno je da TET enzimi mogu prevesti 5hmC u 5-formilcitozin (5fC) a zatim njega u 5-karboksilcitozin (5caC) u sukcesivnim reakcijama oksidacije (Ito i sar., 2011; Vidaković i sar., 2018). Pokazano je da je 5hmC ima 2-3 i 3-4 puta više nego 5fC i

5caC, redom, a takođe ga ima čak 35-400 puta više nego 5-hidroksimetiluracila (5hmU) u mozgu i koži miša kao i u ljudskom mozgu (Liu i sar., 2013).

Sasvim logično, po otkriću TET enzima i njihovih mogućnosti nastale su nove ideje o mogućim mehanizmima demetilacije. Treba uvek imati na umu da TET enzimi predstavljaju prvu kariku u lancu događaja koji vode demetilaciji. Dakle, prvi korak uvek predstavlja oksidacija 5mC koja je posredovana TET enzimima. To samo po sebi može biti dovoljno jer je metilacija uklonjena i zamenjena drugim modifikacijama (5hmC, 5fC ili 5caC) što kroz sukcesivne replikacije pasivno može dovesti do daljeg gubitka metilacije koja se tada ne obnavlja. Naime, pokazano je da DNMT1 ima znatno slabiju sposobnost prepoznavanja 5hmC, 5fC ili 5caC (Jin i sar., 2015) te obnavljanje metilacije CpG naspram ovako modifikovanih C nije efikasno. Ovaj mehanizam se često karakteriše kao kombinovani aktivno-pasivni put: aktivna modifikacija praćena pasivnim, od replikacije zavisnim, gubitkom metilacije.



Slika 1.1. Pregled mogućih puteva aktivne demetilacije započete aktivnošću TET enzima. Punim linijama su obeleženi potvrđeni putevi dok su mogući ali nedovoljno dokazani putevi aktivne demetilacije obeleženi isprekidanom linijom. Preuzeto i prilagođeno iz (Pastor i sar., 2013).

Što se tiče potpuno aktivnih mehanizama TET zavisne demetilacije predloženo je više modela (Slika 1.1). Postoje izvesne indicije da 5caC (koji nastaje u sukcesivnim reakcijama oksidacije 5mC TET enzimima) može biti dekarboksilovan ali enzim koji bi katalizovao ovu reakciju još nije pronađen (Schiesser i sar., 2012). Druga interesantna mogućnost proizilazi iz istraživanja u kom je pokazano da DNMT3a i DNMT3b mogu

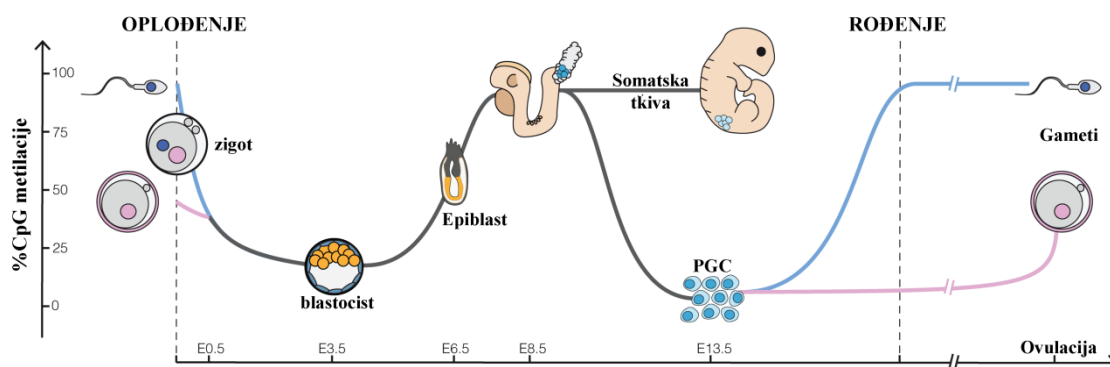
pod određenim uslovima vršiti dehidroksimetilaciju 5hmC *in vitro* (Chen i sar., 2012). Do sada su predložena i dva aktivna mehanizma demetilacije koji uključuju TET enzime i BER reparacioni put. Jedan model predviđa da nakon nastanka 5hmC AID/APOBEC enzimi prevode deaminacijom ovako modifikovan C u 5hmU koji bi dalje bio supstrat za timin-DNK glikozilazu (eng. *thymine DNA glycosylase*, TDG) ili SMUG1 (eng. *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase*) glikozilazu BER puta i na kraju bio zamenjen nemodifikovanim C (Pastor i sar., 2013). Ovaj model je kontraverzan jer je pokazan samo u jednoj laboratoriji dok ga drugi opovrgavaju jer nisu detektovali bilo kakvu aktivnost AID/APOBEC enzima prema 5hmC (Pastor i sar., 2013). Nasuprot tome, drugi predloženi model koji uključuje BER za sada je eksperimentalno najbolje potvrđen. Ovaj mehanizam podrazumeva da nakon prvog koraka formiranja 5hmC, TET nastavlja oksidaciju do formiranja 5fC i 5caC koji bivaju prepoznati i uklonjeni od strane TDG glikozilaze a zatim zamenjeni nemodifikovanim C (Pastor i sar., 2013; Wu i Zhang, 2014). Postoje eksperimentalni dokazi da se TDG glikozilaza vezuje sa većim afinitetom za 5caC:G par nego za svoj klasičan supstrat, pogrešno sparane T:G nukleotide (Pastor i sar., 2013; Zhang i sar., 2012), a takođe pokazuje veću aktivnost prema 5fC:G nego prema T:G paru (Maiti i Drohat, 2011; Wu i Zhang, 2014). Osim toga, u *in vitro* uslovima TDG pokazuje jasnu aktivnost prema 5caC:G i 5fC:G u dvolančanoj DNK (Pastor i sar., 2013; Zhang i sar., 2012). U prilog ovom mehanizmu ide i podatak da u mišjim embrionalnim stem ćelijama, koje nemaju TDG glikozilazu, dolazi do porasta nivoa 5fC i 5caC (Shen i sar., 2013). Ipak, problem predstavlja to što se čak i u ovim ćelijama 5fC javlja znatno ređe nego 5mC a 5caC ima još manje pa je pitanje u kojoj je meri ovaj mehanizam zastupljen (Pastor i sar., 2013). Iz svega navdenog može se zaključiti da uprkos velikom napredku u istraživanjima, i dalje nije jasno koji je zapravo primarni mehanizam aktivne demetilacije ali se svakako ističe neophodnost aktivnosti TET enzima u svim predloženim modelima.

1.3.1. Primeri TET-posredovane aktivne demetilacije DNK

1.3.1.1. TET proteini u reprogramiranju DNK metilacije tokom razvića

Za pravilno embrionalno razviće kao i gametogenezu, osim uspostavljanja i održavanja metilacije DNK važno je i reprogramiranje odnosno brisanje metilacionih obrazaca. Naime, najveći globalni talasi demetilacije dešavaju se kod zigota i u primordijalnim germinativnim ćelijama (eng. *primordial germinative cells*, PGC) embriona. Upravo zato je nakon otkrića TET enzima puno pažnje posvećeno ispitivanju uloge TET-posredovane demetilacije u embrionalnom razviću.

Poznato je da neposredno nakon spajanja jajne ćelije sa spermatozoidom i formiranja zigota dolazi do prvog talasa globalne demetilacije očevog i majčinog pronukleusa (Slika 1.2.) koji su još uvek fizički razdvojeni iako se nalaze u istoj ćeliji (Kafri i sar., 1992; Stenz i sar., 2018). Početni nivo metilacije i brzina demetilacije razlikuju se kod očevog i majčinog (muškog i ženskog) pronukleusa. U okviru očevog pronukleusa demetilacija se završava znatno brže, već pre kraja prve ćelijske deobe, dok se demetilacija majčinog pronukleusa odvija sporije kroz nekoliko sukcesivnih deoba (Seisenberger i sar., 2013). Od ovog globalnog brisanja metilacionih obrazaca izuzeti su imprintovani geni, neki retrotranspozoni kao i heterohromatin centromera (Seisenberger i sar., 2013). Kasnije, u periodu implantacije embriona dolazi do *de novo* metilacije i uspostavljanja novih metilacionih obrazaca (Kafri i sar., 1992; Seisenberger i sar., 2013). Sledeći talas demetilacije dešava se tokom gametogeneze kod PGC (Slika 1.2). Tom prilikom dolazi do obimne globalne demetilacije od koje su izuzeti samo neki od retrotranspozona (Lane i sar., 2003; Seisenberger i sar., 2013). U toku ovog procesa dolazi i do brisanja roditeljskih metilacionih obeležja imprintovanih gena kako bi se, u daljem toku gametogeneze, *de novo* metilacijom uspostavio polno specifičan obrazac metilacije, odnosno novi imprinting koji odražava pol embriona (Hajkova i sar., 2002; Seisenberger i sar., 2013). Kod muških PGC, *de novo* metilacija počinje nekoliko dana nakon završene demetilacije dok se kod ženskih germinativnih ćelija uspostavljanje novih metilacionih obrazaca dešava u oocitama, tek nakon rođenja (Seisenberger i sar., 2013).



Slika 1.2. Reprogramiranje metilacije DNK tokom embrionalnog razvića. Preuzeto i prilagođeno sa sajta: <https://en.wikipedia.org/wiki/Reprogramming> (poslednja promena 29.05.2019.).

Već je pomenuto da do gubitka metilacije DNK muškog pronukleusa u zigotu dolazi vrlo brzo i nezavisno od replikacije. U skladu sa idejom da se ovo dešava preko TET-posredovane demetilacije, pokazano je da je TET3 visoko eksprimiran u mišjim oocitama (Hill i sar., 2014; Wossidlo i sar., 2011). Takođe, obeležavanje antitelima specifičnim za 5hmC potvrdilo je da se ova modifikacija javlja u muškom pronukleusu nakon demetilacije (Hill i sar., 2014; Wossidlo i sar., 2011). Kasnije se signal postepeno gubi tokom daljeg preimplantacionog razvića a paralelno se smanjuje i ekspresija TET3 (Hill i sar., 2014; Wossidlo i sar., 2011). Međutim, novija istraživanja su se bavila detaljnim ispitivanjem kinetike 5mC i 5hmC kod muškog pronukleusa i pokazano je da 5mC nestaje iz očevog genoma pre nego što počne akumulacija 5hmC, tj. do pojave 5hmC dolazi tek nakon što se značajan pad u nivou 5mC već desio (Hill i sar., 2014). Ovo je u suprotnosti sa idejom da je demetilacija posledica transformisanja 5mC u 5hmC jer bi u tom slučaju ovi procesi morali direktno da prate jedan drugi. Takođe model demetilacije preko 5hmC bi trebalo da podrazumeva visok nivo 5hmC u muškom pronukleusu što nije slučaj (Hill i sar., 2014). Na stadijumu embriona od dve ćelije, očev genom prosečno sadrži 5% hidrosimetilacije dok je nivo metilacije u spermiji čak 80% pa bi se očekivalo da se najveći deo te metilacije pretvori u hidrosimetilaciju što se ne dešava (Hill i sar., 2014; L. Wang i sar., 2014). Jedno objašnjenje za neočekivano nizak nivo 5hmC predstavlja mogućnost brze oksidacije 5hmC do 5fC i 5caC s obzirom da je njihovo prisustvo zaista detektovano kod očevog pronukleusa (Hill i sar., 2014; Inoue i sar., 2011). Interesantno je da do gubitka ovih modifikacija dolazi postepeno i to

pasivnim putem zavisnim od replikacija koje se dešavaju u preimplantacionom periodu (Inoue i sar., 2011).

Drugi globalni talas demetilacije u PGC praćen je povećanom ekspresijom TET1 što ukazuje na njegovu ulogu u reprogramiranju (Hill i sar., 2014). U prilog tome ide i detektovano prisutvo 5hmC u okviru imprintovanih sekvenci kod PGC, koje će biti demetilovane tokom reprogramiranja (Hill i sar., 2014). Ipak, opet se kao problem javlja nizak nivo 5hmC u PGC što bi se potencijalno moglo objasniti daljom oksidacijom 5hmC do 5fC i 5caC praćenom brzim uklanjanjem BER reparacionim sistemom (Hill i sar., 2014).

1.3.1.2. TET proteini i demetilacija DNK u patološkim stanjima

Poznato je da kod velikog broja malignih oboljenja dolazi do poremećaja u nivou i rasprostranjenosti 5mC i 5hmC. Brojni hematološki maligniteti ali i solidni kanceri poput melanoma, kancera prostate, dojke, pluća, pankreasa, debelog creva i jetre pokazuju značajno smanjen nivo 5hmC (Kudo i sar., 2012; Yang i sar., 2013). Hematološki maligniteti povezani su vrlo često sa mutacijama koje dovode do smanjenja ili potpunog gubitka funkcije TET2 i smatra se da ove mutacije mogu biti uzrok poremećene hematopoeze i nastanka mieloidnih ili limfoidnih maligniteta (Quivoron i sar., 2011; Yin i Xu, 2016). U istraživanju koje je pokazalo jasnu korelaciju između mieloidnih maligniteta i gubitka katalitičke aktivnosti TET2, izdvojena je i grupa uzoraka kod kojih je primećen pad 5hmC ali nije došlo do mutiranja TET2 (Ko i sar., 2010). Pretpostavlja se da bi jedan od uzroka mogle biti mutacije u genima nekih partner proteina TET2 (Ko i sar., 2010) što ukazuje na značaj rasvetljavanja interakcija u koje stupaju TET proteini a koje bi mogle uticati na njihovu aktivnost.

Iako je do sada najviše pažnje posvećeno ulozi TET enzima i hidrosimetilacije kod malignih oboljenja, sve je više istraživanja koja ukazuju da i druga patološka stanja mogu biti povezana sa poremećenim funkcionisanjem i ekspresijom TET proteina. Poznato je da je 5hmC prisutan u većoj meri u mozgu sisara i da učestvuje u diferencijaciji neurona, razviću mozga kao i procesima učenja i memorije (J. Wang i sar., 2014; Yin i Xu, 2016). Upravo zato izmenjena TET aktivnost povezana je sa različitim neurološkim poremećajima (J. Wang i sar., 2014; Yin i Xu, 2016).

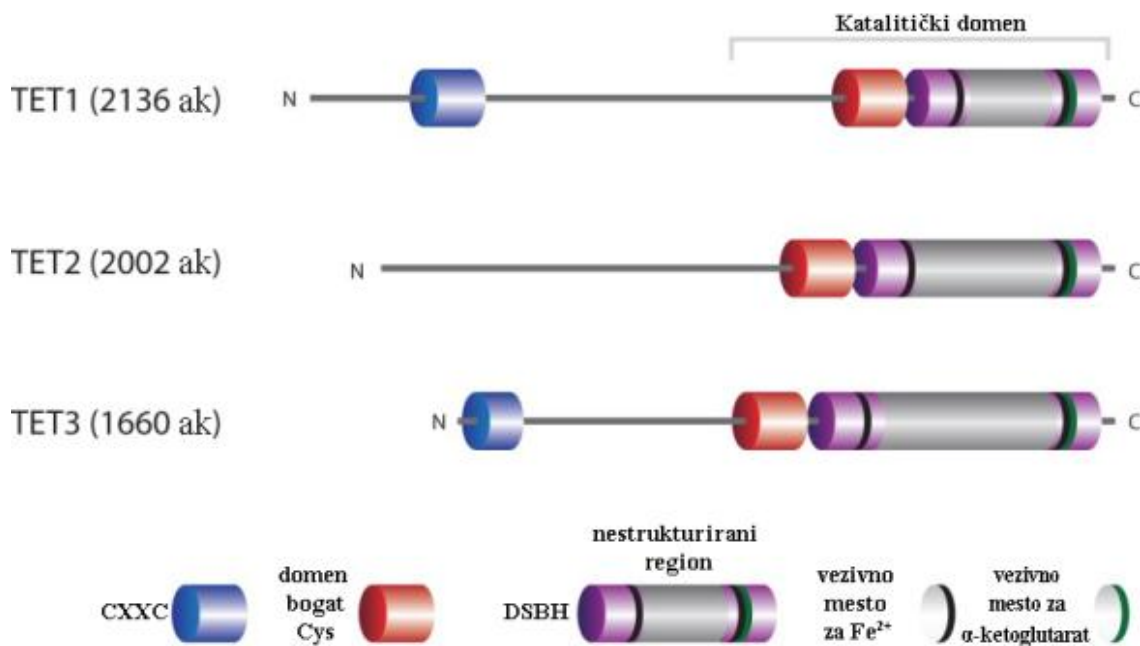
Imajući u vidu da je dijabetes multifaktorijalno oboljenja povezano sa brojnim faktorima rizika ne iznenađuje podatak da brojna istraživanja ukazuju na ulogu epigenetike u razvoju dijabetesa i njegovih komplikacija. Procesi kao što su hiperglikemija, oksidativni stres i inflamacija povezani su sa izmenjenim obrascima metilacije DNK a istovremeno su i odgovorni za poremećenu regulaciju ekspresije gena u dijabetesu (Vidaković i sar., 2018). Kod model sistema zebra ribica pokazano je da hiperglikemija dovodi do stabilne demetilacije uzrokovane porastom u ekspresiji i aktivnosti TET proteina i praćene porastom u nivou 5hmC i 5fC (Dhliwayo i sar., 2014; Ding i Huang, 2014). Smatra se da je ovo novootkriveni mehanizam metaboličke memorije u dijabetesu (Dhliwayo i sar., 2014; Ding i Huang, 2014). Osim toga nedavno objavljeno istraživanje ukazalo je na ulogu TET2 u gubitku β -ćelija pankreasa u dijabetesu (Stefan-Lifshitz i sar., 2019). Naime, pokazano je da medijatori inflamacije dovode do aktivacije TET2 i povećane demetilacije odnosno hidrosimetilacije DNK, što dalje podstiče ekspresiju gena uključenih u inflamaciju i imunski odgovor čime se podstiče autoimunska destrukcija β -ćelija pankreasa (Stefan-Lifshitz i sar., 2019). Nasuprot tome, dijabetes je povezan i sa padom nivoa 5hmC ali u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (Wu i sar., 2018). Smatra se da je uzrok hiperglikemija koja inhibira fosforilaciju TET2 što vodi smanjenju njegove stabilnosti i aktivnosti (Wu i sar., 2018).

Ovo su samo neki od primera učešća TET proteina u patološkim stanjima i očekivano je da će sa budućim istraživanjima, koja se sve više okreću epigenetičkim uzrocima bolesti, biti otkriveno da je sve više oboljenja koja su povezana sa promenama u demetilaciji i hidrosimetilaciji DNK.

1.3.2. Struktura TET proteina

Proteini TET familije, TET1, TET2 i TET3, otkriveni su opsežnom bioinformatičkom analizom, poređenjem aminokiselinskih sekvenci sa predviđenim sekundarnim strukturama, u istraživanju koje je imalo za cilj identifikaciju oksigenaza koje bi imale sposobnost modifikacije 5mC (Tahiliani i sar., 2009). TET proteini spadaju u veliku familiju Fe^{2+}/α -ketoglutarat-zavisnih oksigenaza (Tahiliani i sar., 2009). Pretpostavlja se da koriste kiseonik za oksidativnu dekarboksilaciju α -ketoglutarata pri čemu se formira visoko valentni Fe(IV)-oxo intermedijer sposoban da

prevede 5mC u 5hmC (Kohli i Zhang, 2013; Vidaković i sar., 2018). Katalitički region sva tri enzima nalazi se na C-terminusu i sastoji se od domena bogatog cisteinom (eng. *cysteine*, Cys) praćenog dvolančanim β heliks domenom (eng. *double-stranded β helix domain*, DSBH) (Slika 1.3.) koji ima katalitičku funkciju (Tahiliani i sar., 2009). Domen bogat Cys ne formira zasebnu strukturu već je obmotan oko DSBH i smatra se da je neophodan za enzimsku aktivnost (Hu i sar., 2013) kao i da je uključen u vezivanje TET proteina za DNK (Iyer i sar., 2009). Katalitičku funkciju obavlja DSBH u okviru koga se nalaze i vezivna mesta Fe^{2+} i α -ketoglutarata (Iyer i sar., 2009). Kod metazoa se u okviru DSBH domena nalazi umetnuti nestrukturirani region čija dužina znatno varira među različitim članovima TET familije proteina (Iyer i sar., 2009). Pretpostavlja se da je ovaj nestrukturirani region sa spoljašnje strane globularne strukture koju formira DSBH i da može imati ulogu u protein-protein interakcijama (Iyer i sar., 2009). Osim toga, TET1 i TET3 na svom N-terminusu imaju cistein-X-X-cistein (CXXC) domen cinkanih prstiju (Tahiliani i sar., 2009) (Slika 1.3.). Iako TET2 nema ovaj domen, susedni gen za IDAX kodira CXXC domen vrlo sličan domenu kod TET1 i TET3 proteina. Zato se pretpostavlja da je gen za IDAX zapravo bio deo predačkog *Tet2* gena ali da je inverzijom razdvojen od sekvence koja kodira katalitički domen (Ko i sar., 2013). CXXC domen je prisutan kod brojnih proteina pridruženih hromatinu i najčešće pokazuje jaku preferenciju prema nemodifikovanim CpG dinukleotidima. Za TET1 CXXC domen pokazano je da može da vezuje CpG sekvence bez obzira na to da li je C metilovan (Pastor i sar., 2013) mada je u mišjim embrionalnim stem ćelijama TET1 najčešće pozicioniran kod nemetilovanih CpG-bogatih sekvenci (Wu i Zhang, 2014). Što se CXXC domena kod TET3 tiče on ima sposobnost da vezuje nemodifikovane C bez obzira da li se nalaze u okviru CpG dinukleotida ili ne (Xu i sar., 2012). IDAX se vezuje za nemetilovana CpG ostravca i CpG bogate promotore i direktno interaguje sa TET2 proteinom (Ko i sar., 2013). Interesanto je da IDAX dovodi do degradacije TET2 proteina delovanjem kaspaza, dok kod TET3 proteina CXXC domen negativno utiče na katalitičku aktivost sopstvenog proteina što ukazuje na autoinhibitorni mehanizam regulacije (Ko i sar., 2013; Pastor i sar., 2013; Wu i Zhang, 2014).



Slika 1.3. Struktura proteina TET familije. Preuzeto i prilagođeno iz (Rasmussen i Helin, 2016).

1.3.3. Regulacija aktivnosti TET proteina

Tokom svakog ciklusa oksidacije, TET enzimi prevode α -ketoglutarat u sukcinat i ugljen-dioksid. Patološka akumulacija prirodnih metabolita, sukcinata i fumarata, kao i onkometabolita, 2-hidroksiglutarata dovodi do inhibicije TET aktivnosti jer su sva ova jedinjenja strukturno slična α -ketoglutaratu i mogu se vezati za katalitički centar TET proteina (Yin i Xu, 2016). Pored toga, N-oksalilglicin (NOG) je neaktivni analog α -ketoglutarata koji se takođe koristi kao inhibitor Fe^{2+}/α -ketoglutarat-zavisnih oksigenaza a pokazano je da ima sposobnost inhibicije i TET enzima (Ravichandran, 2017; Yin i Xu, 2016). Ipak, ćelije pokazuju slabu permeabilnost za NOG pa je zbog toga sintetisana njegova esterifikovna forma, dimetil oksalilglicin (DMOG) koja lakše ulazi u ćeliju (Schiller i sar., 2014). Interesantno je da DMOG ne inhibira TET enzime *in vitro* ali ih inhibira *in cellulo* pa se pretpostavlja da nakon ulaska u ćeliju dolazi do njegove deesterifikacije do NOG, jedinjenja koje zapravo ima svojstva inhibitora (Ravichandran, 2017). Treba istaći da svi ovi inhibitori TET enzima nisu specifični i predstavljaju inhibitore cele klase Fe^{2+}/α -ketoglutarat-zavisnih oksigenaza tako da se još uvek traga za odgovarajućim specifičnim inhibitorima TET enzima koji bi značajno unapredili istraživanja.

Vitamin C (VitC), poznat i kao L-askorbinska kiselina, predstavlja važan nutrijent u ishrani sisara (Yin i Xu, 2016). Više istraživanja ukazalo je na pozitivan uticaj ovog vitamina na aktivnost TET proteina i nivo 5hmC (Hore i sar., 2016; Ravichandran, 2017; Yin i Xu, 2016). Iako se inicijalno smatralo da funkcioniše kao kofaktor TET proteina kasnije je ustanovljeno da pozitivan efekat ostvaruje redukcijom Fe^{3+} do Fe^{2+} što je neophodno za funkcionisanje TET proteina (Hore i sar., 2016; Ravichandran, 2017). Drugi vitamin koji dovodi do porasta nivoa 5hmC je retinol (poznatiji kao vitamin A) ali ovaj efekat nije posledica direktnog uticaja na aktivnost TET proteina već porasta ekspresije *Tet2* i *Tet3* do kog dovodi tretman ćelija retinolom (Hore i sar., 2016; Ravichandran, 2017).

1.3.3.1. Posttranslacione modifikacije TET proteina

Osim direktnih i indirektnih uticaja koje različita jedinjenja mogu imati na TET proteine, funkcionisanje proteina TET familije može biti regulisano i posttranslacionim modifikacijama. Među posttranslacione modifikacije TET proteina za sada se ubrajaju acetilacija, fosforilacija, O-GlcNAc (eng. *O-linked N-acetylglucosamine*) glikozilacija, ubikvitinacija kao i poli-ADP-ribozilacija (PARilacija). Različite posttranslacione modifikacije mogu ostvariti brojne uticaje na funkcionisanje modifikovanog proteina. U slučaju TET proteina isti tip modifikacije može imati različite efekte na različite članove TET familije. Acetilacija dva evolutivno konzervirana lizina na N-terminusu pozitivno utiče na TET2 tako što pojačava enzimsku aktivnost ovog proteina, doprinosi njegovoj stabilizaciji i utiče na njegovo ciljano vezivanje za hromatin (Y. W. Zhang i sar., 2017). Osim toga pokazano je i da TET1 i TET3 takođe podležu acetilaciji (Y. W. Zhang i sar., 2017). Poli- i mono- ubikvitinacija imaju suprotne efekte na TET2: poliubikvitinacija dovodi do destabilizacije proteina (Y. W. Zhang i sar., 2017) dok monoubikvitinacija utiče pozitivno na TET2 tako što pospešuje njegovo vezivanje za DNK (Nakagawa i sar., 2015). Najviše izučavana postranslaciona modifikacija TET proteina je O-GlcNAc glikozilacija. Iako postoje neki oprečni podaci, do sada je ustanovljeno da svi proteini TET familije mogu biti O-GlcNAc glikozilovani ali da efekti ove modifikacije nisu isti za TET1, TET2 i TET3 (Balasubramani i Rao, 2013; Dehennaut i sar., 2014). Tako O-GlcNAc glikozilacija inhibira aktivnost TET3 proteina i utiče na njegovu lokalizaciju (Zhang i sar., 2014) dok kod TET1 proteina pozitivno utiče na stabilnost i doprinosi

represivnoj ulozi TET1 u transkripciji (Shi i sar., 2013). Interesantno je da O-GlcNAc glikozilacija utiče i na nivo fosforilacije TET proteina (Bauer i sar., 2015). Naime, po aktivaciji O-GlcNAc glikozilacije TET proteini gube deo fosforilacije koja je u bazalnim uslovima veoma zastupljena na brojnim pozicijama (Bauer i sar., 2015). Za sada je pokazano da AMPK-posredovana fosforilacija serina na poziciji 99 povećava stabilnost TET2 i dovodi do povećanja nivoa 5hmC ali uloga fosforilacije na drugim pozicijama još uvek nije razjašnjena (Wu i sar., 2018). Jedna od najskorije otkrivenih modifikacija TET protein je i PARilacija ali i pored značajnih pomaka u istraživanjima još uvek nije u potpunosti razjašnjen njen uticaj na ovu grupu enzima.

1.4. PARP proteini i PARilacija

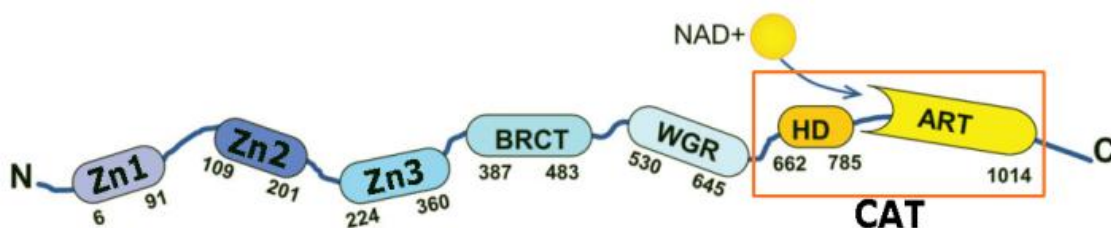
PARilacija predstavlja reverzibilnu posttranslacionu modifikaciju dodavanja poli-ADP-riboznih (PAR) polimera katalizovanu od strane proteina koji pripadaju superfamiliji PARP (eng. *poly(ADP-ribose) polymerase*). Svih 17 članova ove familije kod sisara imaju karakterističan konzervisan katalitički centar ali i pored toga nemaju svi sposobnost formiranja PAR polimera (Gupte i sar., 2017; Hottiger i sar., 2010). Većina članova ove familije katalizuje dodavanje samo pojedinačne ADP-riboze na ciljne proteine (što se naziva mono-ADP-ribozilacija) dok za neke nije ni ustanovljena katalitička aktivnost ali je cela familija nazvana po najpoznatijem članu, PARP-1, koji je prvi otkriven i koji ima sposobnost PARilacije (Gupte i sar., 2017; Hottiger i sar., 2010).

Do PARilacije dolazi zahvaljujući sposobnosti PARP proteina da vežu i iseku nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) tako da se oslobađa nikotinamid dok se ADP-riboza koristi za modifikaciju ciljnih proteina. Najistaknutiji članovi familije, PARP-1 i PARP-2, imaju sposobnost formiranja dugih linearnih ili razgranatih PAR polimera na ciljnim proteinima a poznato je da PARilacija može, kao automodifikacija, biti usmerena i ka samim PARP proteinima. U ćeliji, PARilaciju u najvećoj meri katalizuje PARP-1 dok je udeo aktivnosti PARP-2 značajno niži kako u bazalnim tako i u uslovima koji stimulišu PARP aktivnost (Bai, 2015; Jungmichel i sar., 2013; Vidaković i sar., 2018). Značaj ovih enzima postaje jasan kada se zna da miševi sa uklonjenim genima za PARP-1 i PARP-2 nisu vijabilni (Ménissier de Murcia i sar., 2003). Ipak, uklanjanje samo jednog od ova dva gena ne dovodi do smrtnog ishoda što

ukazuje na delimično preklapajuće uloge dva enzima (Ménissier de Murcia i sar., 2003). Miševi kod kojih je uklonjen jedan od ova dva PARP proteina osetljivi su na jonizujuće zračenje i alkilujuće agense ali u različitoj meri (Chalmers i sar., 2004), dok kod onih kojima nedostaje PARP-2 dolazi i do poremećaja u razvoju određenih tipova ćelija (Yélamos i sar., 2008).

1.4.1. Struktura i aktivnost PARP-1 proteina

Humani PARP-1 sadrži 1014 amino kiselina i sastoji se od 6 domena koji zajedno formiraju protein veličine 116 kDa (Slika 1.4). U okviru konzervisanog C-terminusa nalaze se WGR domen (bogat triptofanom, glicinom i argininom) i katalitički domen (eng. *catalytic domain*, CAT) koji se sastoji od subdomena bogatog zavojnicama (eng. *helical subdomain*, HD) i subdomena ADP-ribozil transferaza (ART). U okviru ART subdomena nalazi se katalitički centar koji vezuje NAD^+ , obavlja inicijaciju dodavanja ADP-riboze na ciljani protein, zatim elongaciju PAR polimera, kao i uvođenje grananja u nastajući polimer (Alemasova i Lavrik, 2019; Langelier i Pascal, 2013). Na N-terminusu se nalaze tri domena cinkanih-prstiju (Zn1, Zn2 i Zn3) kao i domen za automodifikacije (eng. *automodification domain*, AD) koji obuhvata BRCT (eng. *breast cancer associated 1 C-terminus*) motiv. Prva dva domena cinkanih-prstiju (Zn1 i Zn2) omogućavaju prepoznavanje određenih struktura DNK (Langelier i sar., 2011). Domen BRCT i susedne amino kiseline predstavljaju ciljna mesta auto-PARilacije a ovaj region učestvuje i u protein-protein interakcijama (Loeffler i sar., 2011). Za aktivaciju PARP-1 ključni su Zn1, Zn3, WGR domeni koji se zajednički vezuju za DNK formirajući mrežu kontakata između domena (Langelier i sar., 2012). Na taj način ovi domeni povezuju oštećenu DNK sa CAT domenom i destabilizuju autoinhibitorni HD subdomen što dovodi pojačavanja katalitičke aktivnost ART subdomena (Langelier i sar., 2012).



Slika 1.4. Struktura PARP-1 proteina sa obeleženim domenima. Preuzeto i prilagođeno iz (Alemasova i Lavrik, 2019).

Aktivacija PARP-1 podstaknuta je pre svega jednolančanim i dvolančanim prekidima ali i druge netipične DNK strukture poput ukosnica, ukrštenih spojeva ili nesparenih regiona mogu stimulisati PARilaciju (Langelier i sar., 2014; Lonskaya i sar., 2005). U kontaktu sa oštećenom DNK, PARP aktivnost raste 10-500 puta što dovodi do velikog porasta u broju PARilovanih proteina (Rouleau i sar., 2010; Zhen i Yu, 2018). Uspešna aktivacija PARP-1 od strane DNK moguća je samo u prisustvu dvovalentnih jona metala (Mg^{2+} , Ca^{2+}) ili multivalentnih katjona koji pomažu u prevazilaženju jake elektrostatičke barijere nastale usled blizine izrazito negativno naelektrisanih molekula DNK i PAR polimera (Alemasova i Lavrik, 2019). Ipak, i u odsustvu interakcije sa DNK sam CAT domen pokazuje bazalni nivo aktivnosti, odnosno PARilacije ciljnih proteina (Langelier i Pascal, 2013). Regulacija aktivnosti PARP-1 može se postići i preko posttranslacionih modifikacija kao što su fosforilacija, acetilacija, metilacija, sumoilacija i ubikvitinacija (Alemasova i Lavrik, 2019; Krishnakumar i Kraus, 2010). Osim toga poznato je da auto-PARilacija, kao posttranslaciona modifikacija, inhibira katalitičku aktivnost PARP-1 i dovodi do njegovog odvajanja od hromatina, dok nasuprot tome mono(ADP-ribozil)acija od strane drugih PARP enzima dovodi do aktivacije PARP-1 (Krishnakumar i Kraus, 2010; Loseva i sar., 2010). Fizička interakcija sa proteinima, kao što su histoni, p53, ERK2 i mnogi drugi, takođe može uticati na PARP-1 aktivnost bilo da je interakcija direktna ili posredovana molekulima DNK ili PAR polimera (Alemasova i Lavrik, 2019). Interesantno je da neki proteini podložni PARilaciji, ujedno tokom interakcije, stimulišu auto-PARilaciju PARP-1, a čak i proteini koji nisu podložni PARilaciji mogu interagovati sa PARP-1 i regulisati njegovu aktivnost (Alemasova i Lavrik, 2019).

1.4.1.1. PARP inhibitori

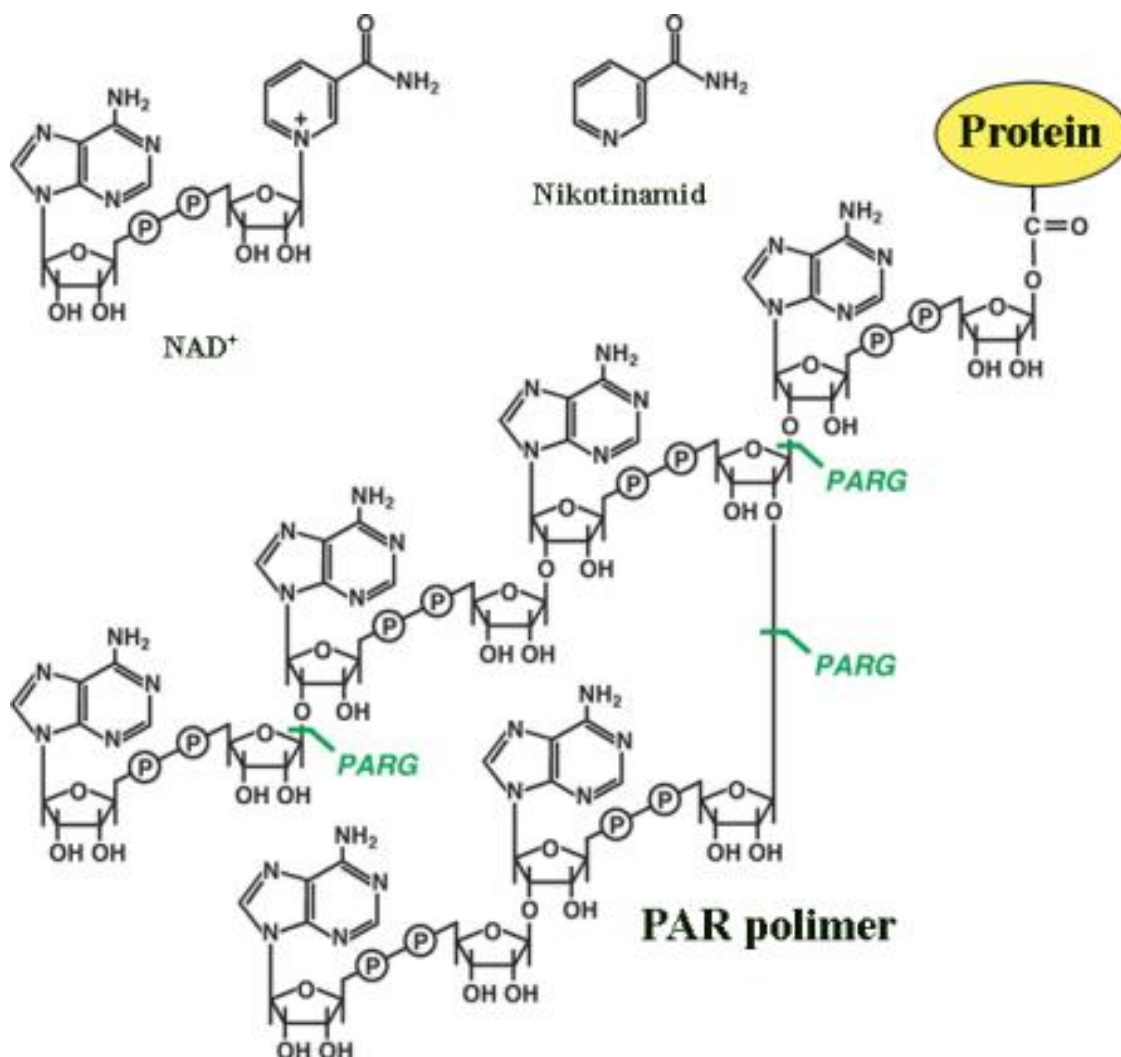
Do inhibicije PARilacije može doći usled interakcije PARP proteina sa određenim jedinjenjima pa tako PARP aktivnost može biti regulisana negativnom povratnom spregom preko nikotinamida koji se oslobađa prilikom sinteze PAR polimera a ujedno deluje i kao PARP inhibitor (Virág i Szabó, 2002). Druga endogeno prisutna jedinjenja koja inhibiraju PARP proteine su purini hipoksantin, inozin i adenzin (Virág i Szabó, 2002, 2001). Interesovanje za PARP inhibitore bilo je podstaknuto idejom da bi inhibicija PARilacije mogla potpomoći radioterapiju i

hemoterapiju određenih tipova malignih oboljenja (Drew, 2015). Prvi sintetisani inhibitor PARP aktivnosti bio je 3-aminobenzamid (3AB). Ova supstanca, kao i nikotinamid, pokazuje slab inhibitorski potencijal, ograničen unos u ćeliju i dodatne nespecifične efekte (Virág i Szabó, 2002). Noviji inhibitori kao što su olaparib, veliparib i niraparib znatno su potentniji i dizajnirani su, kao i 3AB, da budu u kompeticiji sa NAD^+ i da na taj način sprečavaju njegovo vezivanje za katalitički centar PARP proteina (Murai i sar., 2012; Virág i Szabó, 2002). Imajući u vidu da je katalitički centar visoko konzervisan očekivano je da ovi inhibitori nisu selektivni već da pored PARP-1 inhibiraju i PARP-2 kao i druge PARP proteine (Virág i Szabó, 2002). Interesantno je da pored inhibicije katalitičke aktivnosti pomenuti novi PARP inhibitori imaju sposobnost da zarobe PARP-1 i PAR-2 proteine na DNK što dodatno pojačava citotoksični efekat ovih supstanci (Murai i sar., 2012). Klinička ispitivanja pojedinih inhibitora su u toku a olaparib i niraparib su već odobreni za upotrebu u lečenju određenih tipova maligniteta, od strane uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) (Ison i sar., 2018; Kim i sar., 2015). Fokus u kliničkim ispitivanjima PARP inhibitora uglavnom je usmeren ka upotrebi u lečenju određenih tipova kancera dojke ili jajnika (McCann i Hurvitz, 2018) ali zbog širokog spektra funkcija koje obavljaju PARP proteini može se očekivati da će u budućnosti odobreni lekovi dobiti i dodatne namene u terapiji drugih oboljenja.

1.4.2. PAR polimeri

Lanac PAR polimera nastao *in vivo* ima dužinu 5-20 ADP-riboza u normalnim fiziološkim uslovima dok u uslovima stresa dužina novonastalih PAR polimera varira od 50-250 ADP-riboza a *in vitro* sintetisani polimeri mogu dostići i dužinu 400 ADP-riboza (Hassa i Hottiger, 2008). Kada dođe do grananja (Slika 1.5) razmak između dve grane PAR polimera najčešće je dužine 20-60 ADP-riboza (Hassa i Hottiger, 2008). Bazalni nivo PAR polimera u nestimulisanoj ćeliji uglavnom je vrlo nizak ali se u odgovoru na različite fiziološke stimuluse i različite tipove stresa javlja značajan porast PARP aktivnosti i količine PAR polimera (Hassa i Hottiger, 2008; Krishnakumar i Kraus, 2010). Vrlo brzo nakon što je došlo do stimulacije sinteze PAR polimera dolazi i do njihove degradacije koja je takođe brz proces. Većina PAR polimera, koji su nastali nakon stimulacije PARP aktivnosti, degraduje se za manje od 40 s (Alvarez-Gonzalez i

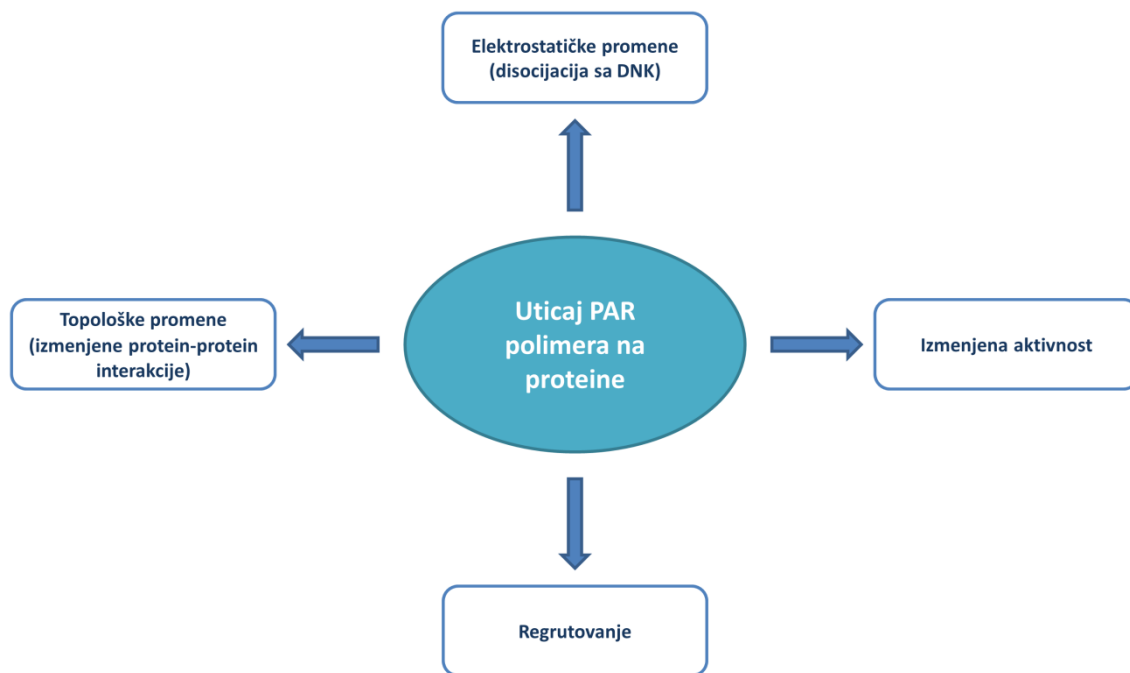
Althaus, 1989; Hassa i Hottiger, 2008). Zbog izuzetne brzine ovog procesa smatra se da degradacija počinje odmah po aktivaciji PARilacije (Hassa i Hottiger, 2008). Nasuprot tome, konstitutivno prisutni PAR polimeri u ćeliji opstaju znatno duže, čak do 7,7 h (Hassa i Hottiger, 2008). Degradaciju PAR polimera obavlja u najvećoj meri enzim poli(ADP-ribozil) glikohidrolaza (eng. *poly(ADP-ribose) glycohydrolase*, PARG) koji pokazuje egzo- i endo-glikozidaznu aktivnost (Slika 1.5) i smatra se da prvo iseca grane PAR polimera a zatim krajnje ADP-riboze sa slobodnog kraja polimera (Heeres i Hergenrother, 2007). Ovaj enzim nije u stanju da ukoloni prvu ADP-ribozu koja je zakačena direktno za protein ali zato TARG1, MACRO D1 i MACRO D2 imaju tu sposobnost (Ciccarone i sar., 2017). Interesantno je da PARG znatno brže degraduje duge nego kratke PAR polimere (Heeres i Hergenrother, 2007). Iako je PARP-1 prisutan u znatno većoj količini od PARG, aktivost PARG može biti i do 100 puta veća nego aktivnost PARP-1. Regulacija balansa aktivnosti ovih enzima omogućava preciznu kontrolu nad količinom PAR polimera što je neophodno za pravilno funkcionisanje signalnih puteva u kojima učestvuje PARilacija (Zhen i Yu, 2018).



Slika 1.5. Struktura PAR polimera, NAD⁺ i nikotinamida. Na slici su obeležena mesta delovanja PARG enzima. Preuzeto i prilagođeno iz (Kim i sar., 2005).

Smatra se da zbog specifičnih biohemijskih karakteristika, PARilacija može značajno izmeniti funkcionisanje ciljnih proteina (Slika 1.6) (Zhen i Yu, 2018). Slično molekulima DNK i ribonukleinske kiseline (RNK), PAR polimeri predstavljaju glomazne, naelektrisane i fleksibilne strukture koje mogu značajno izmeniti elektrostatičke ali i topološke osobine modifikovanog ciljnog proteina (Zhen i Yu, 2018). Zbog izraženog negativnog naelektrisanja PARilacija može dovesti do disocijacije proteina sa DNK koja je takođe negativno naelektrisana i upravo to se dešava nakon auto-PARilacije PARP-1 (Krishnakumar i Kraus, 2010; Zhen i Yu, 2018). Izmenjena topologija modifikovanog proteina može dovesti do promena u protein-protein interakcijama pa tako PARilacija p53 sprečava njegovo vezivanje za eksportni jedarni receptor i dovodi do akumulacije ovog proteina u jedru (Kanai i sar.,

2007; Zhen i Yu, 2018). Aktivnost ciljnog proteina, takođe može biti izmenjena PARilacijom kao što je slučaj sa inhibicijom samog PARP-1 usled intenzivne automodifikacije (Krishnakumar i Kraus, 2010). Osim toga, veliki broj proteina ima sposobnost nekovalentnog vezivanja za PAR polimere koji mogu služiti kao osnova za formiranje dinamične mreže regrutovanih proteina odnosno proteinskih kompleksa (Krishnakumar i Kraus, 2010; Zhen i Yu, 2018).



Slika 1.6. Uticaj PAR polimera na proteine. Preuzeto i prilagođeno iz (Zhen i Yu, 2018).

Postoji više identifikovanih motiva i domena koji prepoznaju PAR polimere i imaju sposobnost da se nekovalentno vežu za njih. Za sada su najbolje okarakterisani PAR-vezujući motivi (eng. *PAR-binding motifs*, PBM), makrodomeni, PAR-vezujući cinkani prsti i WWE domeni. Najviše rasprostranjen modul sa sposobnošću prepoznavanja PAR je PBM koji je prvi i identifikovan pre 19 godina. Ovaj motiv obuhvata oko 20 amino kiselina i definiisan je na osnovu dva konzervisana regiona: region bogat pozitivno naelektrisanim amino kiselinama lizinom (K) i argininom (R) i region sa konsenzusnom sekvencom hxbxhbbhbb (Slika 1.7), hidrofobnih (h) i baznih (b) amino kiselina između kojih se može naći bilo koja amino kiselina (x) (Pleschke i sar., 2000). Bioinformatičkom analizom izdvojeno je oko 500-800 proteina sa ovim motivom među kojima su proteini uključeni u replikaciju i reparaciju DNK, regulaciju ćelijskog ciklusa, modifikacije hromatina i interakciju sa RNK (Gagné i sar., 2008;

Teloni i Altmeyer, 2016). Ostali moduli za prepoznavanje PAR polimera su zastupljeni kod znatno manjeg broja proteina.

			* * * * *
H31	51	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVR	
H4	16	KRRHKVLRDNIQGITKPAIRRLARR	
H2A1	11	RAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	
H2B1	23	KKDGKKRKRSRKESYSI-YVYKVLKQ	
MACS	151	KKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNNK	
p53-1	156	RVRAMAIYKQSQHMTQ-VVRRCPHHER	
p53-2	234	YNYMCNSSCMGGMNRRPILTIIT	
p53-3	329	TLQIRGRERFEMFRELNEALELK	
CDN1	140	RKRRQTSMTDFYHSKRRLIFSKRK	
DPOE	691	KRRLADYCRKAYKKIHITK	
P78527	2729	RRRFMRDQEKLSLMYARKGVAEQKR	
KU70	243	RKVRAKETRKRALSRLKLLKLNK	
XRCC	379	RIVRKEWVLDCHR-MRRRLPSRR	
DNL3	12	KRGTAGCKKCKEKIVK-GVCRIGK	
XPA	215	KQKKFDKKVKELRRAVRSSVWKR	
MSH6	295	KVARKRKRMVTGNGSLKRRSSRK	
NOS2	505	KRRPKRREIPLKVLVKAFLFA	
KBF2	179	KELKKVMDLSIVRLRFSAFLR	
O60521	148	RFQSKSGYLRYSCESTRIRSYLR	
TERT	962	RGFKAGRNMRRKLFGLRLKCH	
Consensus		[. . . . K / R . . .] . h . b . h h b b h h b	

Slika 1.7. Konsenzusna sekvenca PAR-vezujućih motiva prisutna kod različitih proteina. Preuzeto i prilagođeno iz (Pleschke i sar., 2000).

1.4.3. Uloge PARP-1 proteina i PARilacije

Od otkrića PARP enzima 1963. godine (Chambon i sar., 1963) do danas značajno je porastao broj uloga koje se pripisuju PARP-1 mada još uvek nije u potpunosti rasvetljen način funkcionisanja ovog enzima u različitim uslovima i sa brojnim interakcionim partnerima. Prvobitno je ustanovljeno da PARP-1 učestvuje u procesu reparacije DNK tako da je ova uloga najviše ispitivana i najčešće isticana. Do sada je pokazano da PARP-1 učestvuje u reparaciji jednolančanih (eng. *single-strand break*, SSB) kao i dvolančanih (eng. *double-strand break*, DSB) prekida DNK a smatra se da učestvuje i u BER, mada pojedina istraživanja dovode u pitanje značaj PARP-1 za ovaj vid popravke DNK (Krishnakumar i Kraus, 2010; Ray Chaudhuri i Nussenzweig, 2017; Ström i sar., 2011). Oštećenja DNK mogu biti vrlo brzo prepoznata od strane PARP-1 što dovodi do njegove aktivacije i PARilacije velikog broja jedarnih proteina. Povišeni nivo PARP aktivnosti, izazvan oštećenjima DNK, može biti kratkotrajan ili se može održavati i u dužem periodu što zavisi od količine oštećenja i pokrenutih signalnih puteva (Kim i sar., 2005; Krishnakumar i Kraus, 2010). Smatra se da PARP-1 pored uloge senzora oštećenja ima i drugu ulogu, da regrutuje proteine značajne za reparaciju, na mesto oštećenja DNK, direktnom protein-protein interakcijom ili preko nekovalentnog vezivanja proteina za PAR polimere (Krishnakumar i Kraus, 2010). Umerena oštećenja DNK dovode do prolaznog povećanja nivoa PARP aktivnosti što

podstiče reparaciju i omogućava ćeliji da preživi (Kim i sar., 2005; Krishnakumar i Kraus, 2010). Nasuprot tome, kada se jave ozbiljna oštećenja DNK, PARP-1 indukuje ćelijsku smrt. Naime, hiperaktivacija PARP-1 može da dovede do prevelike potrošnje NAD^+ a time i do deplecije ATP što za rezultat ima energetske kolaps i nekrozu ćelije (Ha i Snyder, 1999; Kim i sar., 2005). Do ovog tipa nekrotske smrti može doći kod β -ćelija pankreasa u dijabetesu usled oksidativnog stresa izazvanog hiperglikemijom, koji dovodi do velikih oštećenja DNK i hiperaktivacije PARilacije (Grdović i sar., 2016; Vidaković i sar., 2018). Osim toga, PARP-1 može indukovati i drugi tip ćelijske smrti odnosno apoptozu i to preko oslobađanja AIF pro-apoptotskog faktora iz mitohondrija (Kim i sar., 2005; Yu i sar., 2002).

Iako se najviše ističe uloga PARP-1 u reparaciji DNK, poznato je da ovaj protein učestvuje i u drugim procesima u jedru, odnosno da može da utiče na strukturu hromatina kao i na transkripciju gena kako u bazalnim uslovima tako i u uslovima stresa ili u odgovoru na određene signale. Odavno je poznato da PARilacija histona od strane PARP-1 dovodi do destabilizacije nukleozoma a time i do dekonenzacije hromatina (Kim i sar., 2005; Krishnakumar i Kraus, 2010). Biohemijskim esejima pokazano je da se, u *in vitro* uslovima u odsustvu NAD^+ , PARP-1 vezuje za nukleozome što vodi kondenzaciji hromatina i sprečavanju *in vitro* transkripcije, dok u prisustvu NAD^+ dolazi do auto-PARilacije PARP-1, njegovog odvajanja od nukleozoma i dekonenzacije hromatina što omogućava transkripciju (Kraus, 2008; Wacker i sar., 2007). Takođe, PARP-1 može pozitivno ili negativno da utiče na prisustvo određenih arhitekturnih proteina, kao što su histon H1, HMBG1 i DEK u okviru hromatina, što utiče na strukturu hromatina i transkripciju (Kraus, 2008). Osim toga, PARP-1 može delovati i kao transkripcioni (ko)regulator, direktnim vezivanjem za specifične sekvence ili strukture DNK u okviru promotora i regulatornih sekvenci ili tako što je regrutovan od strane drugih DNK vezujućih faktora (Kim i sar., 2005; Kraus i Lis, 2003; Krishnakumar i Kraus, 2010). Uticaj koji PARP-1 ostvaruje na transkripciju može biti stimulatoran ili inhibitoran i zavisi od konteksta i načina delovanja PARP-1 (Frizzell i sar., 2009; Kraus i Lis, 2003; Krishnakumar i Kraus, 2010). Iako aktivnost PARP-1 može dovesti do regrutovanja transkripcionih faktora i formiranja proteinskih kompleksa u okviru promotora, katalitička aktivnost ovog enzima nije obavezno neophodna za regulaciju transkripcije (Kraus i Lis, 2003; Krishnakumar i Kraus, 2010).

Iako se smatra da PARP-1 stimuliše aktivnosti određenih transkripcionih faktora, postoje indicije i da PARilacija drugih transkripcionih faktora inhibira njihovo vezivanje za DNK (Kraus i Lis, 2003). Postoje i primeri u kojima signalna kaskada dovodi do pokretanja transkripcije gena zahvaljujući PARP-1 koji učestvuje u procesu zamene represivnog kompleksa aktivatorskim kompleksom faktora (Ju i sar., 2006, 2004; Pavri i sar., 2005). Različiti vidovi regulacije transkripcije u kojima je uključen PARP-1 često predstavljaju finalne korake signalnih kaskada čiji je rezultat izmenjena ekspresija ciljnih gena (Krishnakumar i Kraus, 2010). Najbolje okarakterisani signalni putevi u kojima učestvuje PARP-1 su: proinflamatorni NF- κ B-zavisni put ali i odgovor ćelije na toplotni šok kao i hormonski signalni putevi u kojima često učestvuju kinaze koje mogu uticati na aktivnost PARP-1 (Krishnakumar i Kraus, 2010). Pomenuti NF- κ B-zavisni put ima brojne uloge pa tako učestvuje i u dijabetesu. Naime, negativni aspekti aktivnosti PARP-1 u dijabetesu nisu ograničeni samo na ekstremnu potrošnju energije, već PARP-1 može da aktivira NF- κ B što dovodi do produkcije proinflamatornih faktora koji su uključeni u autoimunsku destrukciju β -ćelija pankreasa (Vidaković i sar., 2018).

Sa novijim istraživanjima došla su i nova saznanja o dodatnim ulogama PARP-1-posredovane PARilacije i to u regulaciji metilacije DNK. Prva istraživanja ovog fenomena uglavnom su ukazivala na negativan uticaj PARilacije na nivo 5mC jer je hiperaktivacija PARP-1 uticala na globalni pad metilacije DNK (Guastafierro i sar., 2008) dok su inhibicija PARP-1 (Capoa i sar., 1999) i degradacija PAR polimera (Guastafierro i sar., 2013) doveli do hipermetilacije DNK. U *in vitro* eksperimentima pokazano je i da PAR polimeri, bilo da su slobodni ili vezani za PARP-1, inhibiraju aktivnost DNMT1 (Reale i sar., 2005). Dodatno je ustanovljeno da efekti koje ostvaruje PARilacija na metilaciju DNK mogu biti posredovani proteinom CTCF. Naime, ovaj protein ima funkciju insulatora i preferencijalno se vezuje za ciljne sekvence kada su nemetilovane (Prickett i sar., 2013) a za obavljanje ove funkcije važna je PARilacija njegovog N-terminalnog domena (Yu i sar., 2004). Sam CTCF može da stimuliše aktivnost PARP-1, dovodeći do akumulacije PAR polimera i inhibicije DNMT1 (Guastafierro i sar., 2008). Pretpostavlja se da DNMT1 može biti inhibiran nekovalentnom interakcijom sa PAR polimerima na auto-PARilovanom PARP-1 ili na CTCF, što omogućava da se kontrolni regioni za imprintovanje, za koje su vezani ovi

proteini, održavaju u nemetilovanom stanju (Caiafa i sar., 2009). Utišavanje *Ctcf* gena kao i delecija PAR polimera dovode do pojačane kondenzacije hromatina i globalno porasta metilacije DNK (Guastafierro i sar., 2013). Međutim, pored negativnog uticaja PAR polimera na aktivnost DNMT1 i nivo 5mC, PARP-1 može ostvariti i pozitivan efekat na metilaciju DNK jer ima sposobnost da podstakne ekspresiju *Dnmt1* (Zampieri i sar., 2009). Nakon što su otkriveni TET proteini i njihova uloga u demetilaciji, ispostavilo se da PARP-1 stupa u interakciju sa svim članovima ove familije (Müller i sar., 2014) kao i da potencijalno utiče na TET-posredovanu demetilaciju i hidrosimetilaciju DNK (Ciccarone i sar., 2015, 2012). Iako sve više istraživanja dovodi u vezu TET proteine i PARP-1 kao i demetilaciju i PARilaciju, odnos ovih proteina i njihove aktivnosti još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Za sada je poznato da PARP-1 može uticati na ekspresiju *Tet1* i *Tet2* gena (Ciccarone i sar., 2014, 2012; Roper i sar., 2014), da TET1 može biti PARilovan (Ciccarone i sar., 2015) i da TET1 i TET2 mogu biti regrutovani na određene lokacije u genomu putem nekovalentne interakcije sa PAR polimerima (Fujiki i sar., 2013). Ipak, zbog pojedinih kontradiktornih podataka i kompleksnog uticaja PARilacije na TET1, nekovalentne interakcije TET1 proteina sa PAR polimerima i međusobnog uticaja TET1 i PARP-1, neophodna su dodatna istraživanja kako bi se razjasnio uticaj ovih faktora na (de)metilaciju DNK i regulaciju genske ekspresije kako na globalnom tako i na lokalnom nivou.

1.5. Gen za CXCL12: primer za potencijalnu regulaciju ekspresije putem demetilacije DNK.

Gen za hemokin CXCL12 predstavlja primer gena čija je ekspresija regulisana metilacijom promotora ali je istovremeno i pod kompleksnom kontrolom transkripcionim regulatorima. U regulaciji ekspresije *Cxcl12* gena učestvuju brojni proteini kao što su SP1, C-MYB, EBF, C/EBP α , C/EBP β , STAT3, p53, FOXO3a i HMG I/Y među kojima se posebno ističu PARP-1 kao negativni i YY1 kao pozitivni regulator transkripcije (Marković i sar., 2015, 2013).

Hemokini predstavljaju veliku familiju malih signalnih proteina – citokina koji podstiču migraciju i adheziju raznih tipova ćelija. Karakteristična struktura hemokina

podrazumeva četiri konzervisana Cys koji formiraju dve disulfidne veze (Nagasawa, 2014). Svoju funkciju hemokini obavljaju zahvaljujući interakciji sa svojim transmembranskim receptorima spregnutim sa G proteinima. Hemokin CXCL12 otkriven je kao faktor rasta progenitora B limfocita (Nagasawa i sar., 1994) a takođe je i prvi hemokin za koji je pokazano da je ključan faktor u razviću odnosno u hematopoezi, kardiogenezi, diferencijaciji β -ćelija pankreasa, vaskularizaciji i neurogenezi (Nagasawa, 2014). Signalnu kaskadu CXCL12 pokreće interakcijom sa jednim od svoja dva receptora CXCR4 ili CXCR7. Ekspresija CXCL12 detektovana je u velikom broju različitih organa a pokazano je da do porasta ekspresije posebno dolazi u slučaju oštećenja tkiva (Ratajczak i sar., 2006). Pored klasične uloge hemokina u aktivaciji i migraciji leukocita, CXCL12 je uključen i u procese kao što su angiogeneza i regeneracija i reperacija tkiva (Vidaković i sar., 2015). Zbog svojih brojnih funkcija CXCL12 igra važnu ulogu u mnogim bolestima uključujući kancer, inflamatorna oboljenja, aterosklerozu, HIV i dijabetes (Broxmeyer i sar., 2003; Teicher i Fricker, 2010). Studije su pokazale da CXCL12 ima zaštitni efekat kod ateroskleroze i infarkta miokarda i to baziran na regrutovanju progenitorskih ćelija i neoangiogenezi (Döring i sar., 2014; Hu i sar., 2007; van der Vorst i sar., 2015). Osim toga, CXCL12 poseduje antidijabetogeni potencijal jer pomaže u preživljavanju β -ćelija pankreasa, odnosno u njihovoj zaštiti od apoptoze i nekroze (Dinić i sar., 2016; Grdović i sar., 2014; Vidaković i sar., 2015; Yano i sar., 2007). Ukoliko bi se moglo uticati na ekspresiju *CXCL12* gena, takva intervencija bi mogla predstavljati deo tretmana za bolesti poput dijabetesa. Interesantno je da CXCL12 pokazuje preko 90% homologije na nivou gena ali i na nivou proteina između čoveka i miša (Janssens i sar., 2018) tako da zaključci doneti na osnovu eksperimenata urađenih na mišjim ćelijama mogu biti značajni i za ljude.

Ustanovljeno je da metilacioni status igra važnu ulogu u regulaciji ekspresije *CXCL12* posebno u kancerogenezi. Naime, kod tumora dojke i osteosarkoma smanjena ekspresija *CXCL12*, uzrokovana hipermetilacijom, povezana je sa porastom metastatskog potencijala i smanjenim preživljavanjem pacijenata (Li i sar., 2018; Ramos i sar., 2010). Pokazano je da je inhibicija DNMT1 uticala na obnavljanje sekrecije CXCL12 što je posledično suprimiralo rast tumora i usporilo progresiju osteosarkoma, tako da je ukupan efekat preživljavanja bio povezan sa povećanom

ekspresijom *CXCL12* (Li i sar., 2018). Usled antitumorskog efekta koji ostvaruje povećana ekspresija *CXCL12*, potencijalni pristup terapijskih intervencija mogao bi da uključuje epigenetičku regulaciju ekspresije *CXCL12* putem demetilacije.

2. CILJEVI

Metilacija DNK predstavlja važan epigenetički mehanizam koji pre svega učestvuje u negativnoj regulaciji ekspresije gena. Za razviće i pravilno funkcionisanje organizma bitno je uspostavljanje ali i uklanjanje metilacionih obrazaca. Iako je metilacija DNK jedna od najviše izučavanih epigenetičkih modifikacija, mehanizam aktivne demetilacije dugo je bio nepoznat. Identifikacija TET proteina kao inicijatora demetilacije otvorila je put ka daljem izučavanju ovog procesa. Proteini TET familije započinju proces demetilacije tako što katalizuju oksidaciju 5mC do 5hmC (Iyer i sar., 2009; Tahiliani i sar., 2009). Od kada su otkriveni TET proteini, brojna istraživanja se bave proučavanjem njihovih interakcionih partnera kao i faktora koji utiču na njihovu aktivnost. Poznato je da su mnoga patološka stanja povezana sa izmenjenim obrascima metilacije tako da je upoznavanje osnovnih mehanizama koji regulišu (de)metilaciju od izuzetne važnosti.

Protein PARP-1 je uključen u brojne procese u ćeliji kao što su reparacija DNK, remodelovanje hromatina i regulacija transkripcije. Ovaj protein ima sposobnost kovalentne modifikacije ciljnih proteina (uključujući i sam PARP-1) formirajući na njima linearne ili razgranate polimere ADP-riboze u procesu PARilacije. Pored toga, brojni proteini mogu nekovalntno interagovati sa PAR polimerima preko specifičnih aminokiselinskih motiva. Novija istraživanja su pokazala da PARP proteini i PARilacija ostvaruju uticaj na (de)metilaciju DNK ne samo preko DNMT već i preko TET proteina. Sve više je podataka koji ukazuju na ulogu PARP-1 u aktivnoj demetilaciji DNK posredovanoj TET enzimima a predložen je i model po kome TET proteini mogu biti regrutovani na određene pozicije u genomu posredstvom nekovalentne interakcije sa PAR polimerima (Fujiki i sar., 2013). Iako je već ustanovljeno da TET proteini mogu interagovati sa PARP-1 proteinom (Ciccarone i sar., 2015; Müller i sar., 2014) postoje kontradiktorni podaci o uticaju koji PAR polimeri i PARilacija ostvaruju na TET-posredovanu demetilaciju DNK. Pored toga, poznato je da u regulaciji ekspresije *Cxcl12* gena učestvuju i PARP-1 i metilacija DNK (Li i sar., 2018; Marković i sar., 2013; Ramos i sar., 2010) tako da je ovo odličan ciljni gen za ispitivanje efekata TET-PARP interakcije na lokalnom nivou. Hemokin CXCL12 važan je za različite procese u razviću ali ima važnu ulogu i u brojnim bolestima. Poznato je da hipremetilacija

promotora *Cxcl12* gena pospešuje progresiju određenih tipova maligniteta (Li i sar., 2018; Ramos i sar., 2010) pa je rasvetljavanje mogućih puteva regulacije lokalne demetilacije osnova za nove pristupe u terapiji ovih oboljenja. S obzirom da CXCL12 poseduje antidijabetogeni potencijal (Dinić i sar., 2016; Grdović i sar., 2014; Vidaković i sar., 2015; Yano i sar., 2007), mogućnost uticaja na ekspresiju ovog hemokina mogla bi predstavljati dodatni pristup i u lečenju dijabetesa.

Shodno tome, opšti cilj ove doktorske disertacije je da se ispita funkcionalna veza TET proteina i PARP-posredovane PARilacije u procesu demetilacije DNK, kako na globalnom nivou tako i lokalno, na primeru gena za hemokin CXCL12. Kako bi se realizovao opšti cilj, postavljeni su sledeći posebni ciljevi:

- **1. Ispitati međusobne interakcije TET1 sa PARP-1 enzimom i PAR polimerima.** Prvo će biti ustanovljen stepen kolokalizacije TET1 i PARP-1 proteina a potom postojanje njihove međuproteinske interakcije *in cellulo*. Nakon toga, u *in vitro* eksperimentima, ispitaće se da li je TET1 podložan PARilaciji i da li ima sposobnost nekovalentne interakcije sa PAR polimerima.
- **2. Ustanoviti uticaj aktivnosti PARP-1 na TET1 u procesu oksidacije 5mC do 5hmC (hidroksimetilacija) tokom demetilacije DNK.** Nakon PARilacije TET1 proteina posredstvom PARP-1 enzima biće ispitana *in vitro* kinetika aktivnosti TET1 u procesu oksidacije 5mC do 5hmC.
- **3. Ispitati uticaj PARP-1 i PARilacije na (de)metilaciju i hidroksimetilaciju DNK, na globalnom nivou.** Prvo će biti ispitan nivo ekspresije ključnih gena za procese (de)metilacije (*Tet1*, *Tet2*, *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*) u ćelijskim linijama koje reflektuju prisustvo PARP-1 (NIH3T3) i odsutvo PARP-1 (PARP-/-). Potom će biti analiziran metilacioni status kao i nivo hidroksimetilacije u NIH3T3, PARP-/- kao i u NIH3T3 ćelijama koje su tretirane inhibitorom PARilacije.
- **4. Ispitati funkcionalni značaj lokalnih efekata interakcije TET enzima sa PARP-1 na primeru Cxcl12 gena.** Najpre će biti ustanovljen nivo ekspresije *Cxcl12* u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama a zatim će se ispitati uticaj demetilacije na ekspresiju *Cxcl12*. Nakon toga, biće analiziran metilacioni profil *Cxcl12* gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama. Ukoliko se detektuje tendencija demetilacije *Cxcl12* gena u odsustvu PARP-1, ispitaće se uticaj aktivnosti TET enzima na ekspresiju *Cxcl12* kao i prisustvo TET enzima na promotorskom regionu ovog gena u istim

ćelijskim linijama. Na taj način biće ustanovljen potencijalni uticaj TET-posredovane demetilacije na izmenjenu ekspresiju *Cxcl12* gena u odsustvu PARP-1.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. *In vitro* metode

3.1.1. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantnih proteina

Protokol prečišćavanja katalitičkih domena TET proteina optimizovan je u laboratoriji dr Tomasza Jurkowskog (Ravichandran, 2017). Soj bakterija *E.coli* BL21 (DE3) CodonPlus RIL (Novagen) transformisan je vektorom pET28a(+) koji sadrži sekvencu histidinom obeleženog katalitičkog domena mišjeg TET1 (amino kiseline 1367-2038) ili katalitičkog domena mišjeg TET2 (amino kiseline 1044-1920, sa delecijom sekvence amino kiselina 1407-1766) ili celog mišjeg PARP-1 proteina. Nakon što su transformisane ćelije formirale kolonije na podlozi od agara, jedna kolonija prebačena je u 20 ml Luria Bertani (LB) medijuma koji sadrži 25 µg/ml antibiotika kanamicina. Usledila je inkubacija od 8 h na 37°C nakon čega je 10 ml prebačeno u novu posudu sa 1000 ml LB medijuma sa kanamicinom i rastvorom smeše metala. Kultura bakterijskih ćelija gajena je na 37°C do dostizanja optičke gustine 0,6-0,8 a zatim je temperatura smanjena na 20°C i indukovana je produkcija rekombinantnog proteina pomoću 0.5 mM IPTG (eng. *β-D-1-thiogalactopyranoside*). Nakon 14-15 h ćelije su prikupljene centrifugiranjem (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific) a zatim su isprane STE puferom (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8). Prikupljene ćelije čuvane su na -20°C do dalje upotrebe.

Zamrznute ćelije koje sadrže histidinom obeleženi rekombinantni protein otopljene su i isprane puferom za sonifikaciju i ispiranje (50 mM HEPES pH 6,8, 35 mM imidazol, 1 mM DTT, 500 mM NaCl, 10% glicerol) kom je dodat koktel proteaznih inhibitora (1 mM of AEBSF, 0,8 µM aprotinin, 50 µM of bestatin, 15 µM E-64, 5 mM EDTA, 20 µM leupeptin, 10 µM pepstatin A). Nakon toga ćelije su sonifikovane: 25-30 ciklusa, 40% snage - 15 s sonifikacije praćeno sa 45 s pauze (Bandelin Sonoplus sonifikator), a dobijeni lizat centrifugiran je na 38800 x g, 75 min, na 4°C (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific). Supernatant je zatim prebačen na prethodno ekvilibrisanu kolonu Ni-NAT agaroznih kuglica (Genaxxon, Germany) i kolona je isprana sa 200 ml pufera za sonifikaciju i ispiranje. Elucija je postignuta

pomoću rastvora imidazola visoke koncentracije (50 mM HEPES pH 6,8, 300 mM imidazol, 1 mM DTT, 500 mM NaCl, 10% glicerol). Frakcije eluata sa najvećom koncentracijom proteina su spojene a zatim podvrgnute dijalizi u trajanju od 3h u dijaliznom puferu (50 mM HEPES pH 6,8, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 10% glicerol). Alikvoti prečišćenog rekombinantnog proteina zamrznuti su u tečnom azotu i čuvani su na -80°C.

Prisustvo proteina očekivane veličine u prečišćenim uzorcima provereno je elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE), pri denaturišućim uslovima, u prisustvu natrijumdodecilsulfata (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) i glicina (tris-glicinska SDS-PAGE elektroforeza) u 16% poliakrilamidnom (PAA) gelu koji je nakon toga obojen Coomassie plavim.

3.1.2. *In vitro* PARilacija TET proteina

Reakciona smeša za *in vitro* PARilaciju sadržala je 50 mM Tris-HCl pH 8, 1,5 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 0,25 µg/µl DNK sperme lososa (za aktivaciju PARP-1), 5 µM perčišćeni rekombinantni katalitički domen mišjeg TET1 ili TET2 proteina i 100 U humanog rekombinantnog PARP-1 proteina (Enzo Life Sciences, Inc.). Reakcija PARilacije započeta je dodavanjem NAD⁺ u 200 µM finalnoj koncentraciji a zaustavljena je dodavanjem pufera za uzorke (2% SDS, 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% β merkaptotanol i 8,8% glicerol, 100 mM ditiotritol, 0.02% bromofenol plavo) nakon 5 min, 15 min, 30 min i 60 min. Pored toga, jedna reakcija *in vitro* PARilacije TET2 nakon 60 min zaustavljena je dodavanjem 8 µM nirapariba (MedChemExpress) nakon čega je dodat PARG enzim (Trevigen) u finalnoj koncentraciji 0,043 ng/µl. Reakcija uklanjanja PAR polimera PARG enzimom zaustavljena je nakon 1 h dodavanjem pufera za uzorke.

Uzorci su potom razdvojeni tris-glicinskom SDS-PAGE elektroforezom na 10% PAA gelu, nakon čega su razdvojeni proteini preneti na nitroceluloznu membranu pod uticajem 50 mA konstantne struje u trajanju od 1 h. Membrana je obojena Ponceau-S bojom (1% Ponceau-S rastvoren u 5% sirćetnoj kiselini) i slikana a nakon ispiranja boje je dalje korišćena za imunoblot analizu pomoću mišjeg anti-PAR antitela (1:1000, Enzo Life Sciences, Inc., H10) i mišjeg antitela koje prepoznaje histidinom obeležene proteine - anti-HIS (1:2000, Roche). Inkubacija membrana u primarnom antitelu trajala

je preko noći na 4°C a narednog dana membrane su inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim kozjim anti-mišjim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) (1:10000, GE Health care). Vizualizacija je urađena na filmu pomoću ECL (eng. *enhanced chemiluminescence solution*) reagensa (Thermo Scientific).

3.1.3. Dot-blot analiza nekovalentne interakcije TET1 proteina i slobodnih PAR polimera

Korišćenjem dot-blot sistema (Bio-Rad) proteini su naneti na nitroceluloznu membranu. Proteini su razblaženi do odgovarajuće koncentracije u TTBS (eng. *tris-tween-buffered saline*) puferu (0,2% Tween, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl) i naneti su: prečišćeni TET1 (0,025 µM, 0,1 µM, 1 µM), histon H3.1 (New England Biolabs) kao pozitivna kontrola (0,025 µM, 0,1 µM) i 0,5U dezoksiribonukleaze (DNKaze) I (Thermo Scientific) kao negativna kontrola. Membrana je isprana TTBS puferom i potom je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi u 10 nM rastvoru slobodnih PAR polimera (Trevigen). Nakon višestrukog ispiranja TTBS puferom membrana je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi sa primarnim anti-PAR antitelom (1:1000, Enzo Life Sciences, Inc.) a zatim još 1 h na sobnoj temperaturi sa anti-mišjim HRP-konjugovanim antitelom (1:10000, GE Health care). Vizualizacija signala urađena je pomoću ECL reagensa (Thermo Scientific).

3.1.4. Esej za analizu kinetike aktivnosti TET proteina

Esej za analizu kinetike aktivnosti TET proteina zasniva se na ELISA (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) metodi i razvijen je u laboratoriji dr Tomasza Jurkowskog (Ravichandran, 2017). Ovim esejem proverava se brzina reakcije oksidacije 5mC do 5hmC od strane TET proteina. Za esej je korišćen metilovan DNK supstrat dužine 86 baznih parova amplifikovan lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) sa pUC19 vektora (pomoću prajmera DpnII_pUC19_f: 5'-GAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCA-3' i DpnII_pUC19_r: 5'-CAACTATGGATGAACGAAATAGACAGAT-3'). Prajmer DpnII_pUC19_f je bio obeležen biotinom na 5' kraju kako bi se DNK supstrat mogao vezati za bunariće mikrotitar ploče obložene avidinom. U PCR reakciji, u smeši nukleotida umesto

dezoksicitidin trifosfata (dCTP) dodat je metilovani dezoksicitidin trifosfat (5mdCTP) tako da su svi C u okviru DNK supstrata bili metilovani. Princip eseja je da se ovaj biotinirovani metilovan DNK supstrat podvrgne TET-posredovanoj demetilaciji nakon čega se prebacuje u bunarić mikrotitarploče obložene avidinom. Nivo nastalog 5hmC detektuje se primenom odgovarajućeg primarnog i sekundarnog antitela merenjem signala na ELISA čitaču.

Pre početka eseja mikrotitar ploča sa 96 bunarića je obložena avidinom (1.3 µg po bunariću, Sigma Aldrich) tako što je inkubirana u avidinu rastvorenom u 0,1 M NaHCO₃, pH 9,6 tokom 12 h. Nakon toga ploča je tri puta isprana sa PBST (eng. *phosphate-buffered saline with Tween*) puferom (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM K₂HPO₄, pH 7,4, 0,1% Tween) kom je dodat NaCl do 500 mM finalne koncentracije (PBST-500). Potom je u bunariće sipano po 100 µl 0,05 M NaOH rastvora. Pre početka reakcije rekombinantni TET1 podvrgnut je *in vitro* PARilaciji sa rastućim koncentracijama rekombinantnog prečišćenog PARP-1 (50 mM HEPES pH 6,8, 1,5 mM DTT, 400 ng metilovanog DNK supstrata, 1 µM prečišćeni TET, rastuće koncentracije PARP-1, 200 µM NAD⁺), 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga u reakcionu smešu dodati su reagensi neophodni za aktivaciju TET proteina (100 µM Fe²⁺, 1 mM αKG, 1 mM VitC, 150 mM NaCl) i temperatura je podignuta na 37°C. U određenim vremenskim tačkama (0 s, 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 7,5 min, 10 min) alikvoti zapremine 2 µl (40 ng biotinirovanog DNK supstrata) naliveni su u bunariće mikrotitar ploče kako bi se reakcija zaustavila u rastvoru NaOH. Biotinirovani DNK supstrat inkubiran je u bunarićima obloženim avidinom tokom 1,5 h mućkanja. Nakon tri ispiranja sa puferom PBST-500, nespecifično vezivanje antitela blokirano je dodavanjem 2% rastvora govedeg serum albumina (eng. *bovine serum albumine*, BSA) (Roth) rastvorenim u PBST puferu, i inkubacijom u trajanju od 1 h. Sledeći korak bila je inkubacija sa primarnim zečjim anti-5hmC antitelom (1:10000, Active Motif) u trajanju od 1,5 h. Potom je sledilo ispiranje i inkubacija sa kozjim anti-zečjim HRP-konjugovanim sekundarnim antitelom (1:5000, GE Healthcare) u trajanju od 1 h. Nakon ispiranja signal je razvijen pomoću ECL reagensa (Thermo Scientific) i detektovan na 2300 EnSpire Multimode ELISA čitaču (Perkin Elmer).

Kinetika aktivnosti TET1 izmerena je u uzorcima: kontrolni TET1, TET1 koji je pre početka eseja inkubiran 5 min sa puferom za dijalizu bez PARP-1 i TET1 koji je pre

početka eseja inkubiran (*in vitro* PARilovan) 5 min sa rastućim koncentracijama PARP-1 (0,125 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M). Pošto su uslovi *in vitro* PARilacije prilagođeni optimalnim uslovima za aktivnost TET1, uspešnost PARilacije proverene je tris-glicinskom SDS-PAGE elektroforezom na 10% PAA gelu praćenom transferom na nitroceluloznu membranu i imunoblot analizom pomoću mišjeg anti-PAR antitela (1:1000, Enzo Life Sciences, Inc., H10).

Krive koje odražavaju kinetiku aktivnosti TET1 proteina konstruisane su aproksimiranjem trenda promene signala (sa trajanjem reakcije) eksponencijalnom funkcijom pomoću metode najmanjih kvadrata, korišćenjem GraphPad Prism 5 softvera. Početne brzine reakcija izračunate su pomoću linearne regresije na osnovu izmerenog signala u početnim vremenskim tačkama kinetike TET aktivnosti a zatim su izračunate vrednosti normalizovane spram kontrolne reakcije. Eksperiment je nezavisno ponovljen dva puta.

3.2. Ćelijska kultura

U okviru ovog istraživanja, koristile su se ćelijske linije mišjih embrionalnih fibroblasta NIH3T3 (ATCC-CRL-1658) i embrionalnih fibroblasta izolovanih iz miševa kojima je isključen gen za PARP-1 (PARP-/-) (de Murcia i sar., 1997). Ćelije su gajene u modifikovanom Dubelko medijumu (eng. *Dubelco's Modified Eagle Medium*, DMEM) (Biological Industries) u koji su dodati antibiotici (penicilin i streptomycin) i 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS). Ćelije su gajene na temperaturi od 37°C sa 5% CO₂ u atmosferi. Nakon dostizanja oko 80% konfluentnosti ćelije su tripsinizovane i ponovo kultivisane.

3.2.1. Tretmani ćelija

U okviru ovog istraživanja korišćeno je više različitih tretmana ćelija. Ćelije su sejane u sterilne ploče sa 6 bunara. Tretman 10 μ M niraparibom trajao je 72 h sa obnavljanjem tretmana na svakih 24 h. Pošto je niraparib rastvoren u dimetil sulfoksidu (DMSO) a zatim razblaživan u medijumu, dodatnu kontrolu predstavljao je tretman ćelija 0,1% DMSO što je ekvivalentno finalnoj koncentraciji DMSO u medijumu prilikom tretmana ćelija 10 μ M niraparibom. Tretman niraparibom i DMSO primenjen je na NIH3T3 ćelije. Tretman 10 μ M VitC trajao je 48 h sa obnavljanjem tretmana na

svakih 24 h a tretman 1 mM DMOG trajao je 24 h. Oba tretmana primenjena su na NIH3T3 i PARP-/- ćelije. Tretman 15 μ M 5aza trajao je 72 h sa obnavljanjem tretmana na svakih 24 h i tretirane su samo NIH3T3 ćelije.

3.2.2. Test vijabilnosti ćelija

Vijabilnost ćelija ispitana je 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid (MTT) esejem. Ćelije su sejane u sterilne ploče sa 96 bunarića, i po dostizanju 60-70% konfluentnosti tretirane su sa rastućim koncentracijama nirapariba (1,25 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M), VitC (10 μ M, 100 μ M, 1 mM) ili DMOG (10 nM, 0,3 mM, 1 mM, 10 mM). Po završetku tretmana medijum je uklonjen i u bunariće je dodato po 200 μ l MTT (Sigma, M5655), koncentracije 0,5 mg/ml rastvorenog u DMEM medijumu. Inkubacija na 37°C u mraku trajala je 2 h. Potom je medijum sa MTT odličen a naliveno je 100 μ l DMSO po bunariću, kako bi se rastvorili formirani kristali formazana. Apsorbanca je izmerena na 570 nm pomoću ELISA čitača. Vijabilnost ćelija je izračunata na osnovu poređenja sa kontrolnim ćelijama koje su bile 100% vijabilne. Eksperiment je nezavisno ponovljen tri puta.

U daljim eksperimentima, za tretmane ćelija izabrane su koncentracije: 10 μ M niraparib i 1 mM DMOG, bliske onima koje dovode do 50% pada vijabilnosti odnosno inhibicije rasta ćelijske kulture (IC50). Za tretman ćelija VitC izabrana je 10 μ M koncentracija VitC za koju je poznato iz literature da utiče na demetilaciju DNK (Minor i sar., 2013).

3.3. Imunocitohemija

Imunocitohemijsko bojenje primenjeno je za (i) procenu kolokalizacije TET1 i PARP-1 u NIH3T3 ćelijama, (ii) poređenje nivoa 5hmC na HALO preparatima NIH3T3 i PARP -/- ćelija, (iii) određivanje nivoa 5hmC u kontrolnim NIH3T3, NIH3T3 ćelijama tretiranim niraparibom i DMSO i PARP-/- ćelijama.

3.3.1. Ispitivanje kolokalizacije proteina imunocitohemijским bojenjem

Za ispitivanje kolokalizacije, ćelije su sejane na okrugla stakalca prečnika 13mm (2×10^4 ćelija po stakalcu) a potom su inkubirane preko noći kako bi se pričvrstile za podlogu. Nakon toga ćelije su gajene na stakalcima 72 h. Stakalca sa NIH3T3 ćelijama su prvo isprana PBS (eng. *phosphate-buffered saline*) puferom (20 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KCl, 70 mM KH_2PO_4 , 340 mM NaCl, pH 7,4) a zatim su ćelije fiksirane 2% paraformaldehidom (PFA) 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon fiksiranja, stakalca sa ćelijama su isprana PBS puferom. Potom je izvršena permeabilizacija ćelija pomoću 0,25% deterdženta Triton X-100 rastvorenog u PBS puferu, na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min. Ćelije su isprane PBS puferom još tri puta po 5 min. Sprečavanje nespecifičnog vezivanja antitela postignuto je blokiranjem u 3% BSA u trajanju od 1 h. Nakon blokiranja stakalca su isprana sa PBST puferom za ispiranje koji je korišćen i za razblaživanje svih antitela. Stakalca su potom inkubirana preko noći na 4°C sa zečjim anti-TET1 antitelom (1:10000, Merck Millipore). Nakon toga stakalca su isprana puferom za ispiranje, pet puta po 3 min, a potom inkubirana sa sekundarnim kozjim anti-zečjim Alexa Fluor 647 antitelom (1:400, Invitrogen), 2 h na sobnoj temperaturi. Posle inkubacije, stakalca su isprana puferom za ispiranje, pet puta po 3 min, a potom inkubirana sa pacovskim anti-PARP-1 antitelom (1:25, R&D Systems) preko noći na 4°C . Narednog dana ponovljeno je ispiranje, pet puta po 3 min, i stakalca su inkubirana, 2 h na sobnoj temperaturi, sa sekundarnim anti-pacovskim FITC antitelom u razblaženju 1:400. Nakon ispiranja u puferu za ispiranje (pet puta po 3 min) stakalca su isprana i u destilovanoj vodi. Nakon dodavanja Mowiol reagensa (Calbiochem) stakalca su postavljena na mikroskopske pločice.

Ovako pripremljeni preparati, nakon sušenja, fotografisani su na Leica TCS SP5 II konfokalnom mikroskopu (ekscitacija laserom talasne dužine 488 nm i 633 nm). Kao kontrola nespecifičnog signala korišćena su stakalca sa ćelijama koja su prošla celu proceduru ali nisu inkubirana sa primarnim antitelima već sa puferom za ispiranje. Kod ovih preparata nije uočen značajan fluorescentni signal. Analiza kolokalizacije urađena je pomoću LAS AF softvera koji nivo kolokalizacije računa kao odnos ukupne površine na kojoj je detektovana kolokalizacija signala i površine dela slike koji ne pripada pozadini.

3.3.2. Priprema jedarnih HALO preparata i imunobojenje

Jedarni HALO preparati pripremljeni su prema protokolu iz rada Vidaković i saradnika (2005). Nakon tripsinizacije ćelija i ispiranja PBS puferom, jedra su izolovana inkubacijom na ledu u CSK puferu (10 mM Pipes, 100 mM NaCl, 0,3 M sukroza, 30 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) tokom 15 min. Jedra ($1,5 \times 10^4$) su prenešena na mikroskopske pločice centrifugiranjem 5 min na 800 rpm pomoću Cytospin centrifuge (Thermo Shandon). Nakon toga pločice sa preparatima su inkubirane 3 min u ekstrakcionom puferu (0,25 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM Pipes, pH 6,8, 10 mM EDTA, 0,1% digitonin, 0,05 mM spermin, i 0,125 mM spermidin) kako bi se jedra permeabilizovala i ekstrahovali histoni i solubilni proteini. HALO strukture nastaju kao rezultat ovog procesa jer nakon ekstrakcije dolazi do oslobađanja DNK petlji koje ostaju zakačene za preostale proteine samo preko S/MAR (eng. *scaffold/matrix attachment region*) regiona i formiraju oreol oko jedra. Pločice sa preparatima dalje su serijski ispirane u 10 x, 5 x, 2 x, i 1 x koncentrovanom PBS puferu a zatim i u etanolu rastućih koncentracija (70%, 90% i 100%). Nakon toga pločice su osušene i fiksirane na 60-70°C tokom 2 h a zatim su čuvane zamrznute na -20°C.

Pre imunobojenja pločice su otopljene i temperirane na sobnoj temperaturi. U sledećem koraku rehidratacija je postignuta potapanjem pločica u PBS puferu a zatim su preparati permeabilizovani sa 0,25% Triton X-100 u PBS puferu. Nakon ispiranja PBS puferom, DNK je denaturisana inkubacijom pločica u 0,01 N HCl 10 min na 37°C a zatim inkubacijom u puferu 100 mM Tris-HCl, pH 8, 10 min na sobnoj temperaturi. Pločice su potom inkubirane u 70% dimetilformamidu koji je dodatno sadržao 0,3 M NaCl i 30 mM trinatrijum citrat. Nakon ispiranja PBS puferom, preparati su blokirani 30 min u 1% BSA. Posle blokiranja preparati su inkubirani sa primarnim anti-5hmC antitelom (1:50, Active Motif) preko noći na 4°C. Nakon ispiranja PBS puferom, preparati su inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim fluorescentno obeleženim, magarećim anti-zečijim FITC antitelom (1:400, Invitrogen). Višak anitela uklonjen je ispiranjem PBS puferom. Nakon toga preparati su obojeni propidijum jodidom radi vizualizacije DNK. Nakon dodavanja Mowiol reagensa na preparate, pločice su prekrivene pokrovnim staklom. Nakon sušenja Mowiol reagensa preparati su posmatrani i slikani pomoću AxioCam kamere povezane sa Axio Observer Z1 mikroskopom (Carl Zeiss Microscopy).

3.3.3. Određivanje nivoa 5hmC imunocitohemijским bojenjem

Za određivanje nivoa 5hmC ćelije su sejane na okrugla stakalca prečnika 13 mm (2×10^4 ćelija po stakalcu) a potom su inkubirane preko noći kako bi se pričvrstile za podlogu. Nakon toga ćelije su gajene na stakalcima 72 h sa ili bez tretmana. Za određivanje nivoa 5hmC pripremljena su stakalca na kojima su gajene: kontrolne NIH3T3 ćelije, NIH3T3 ćelije tretirane 0,1% DMSO, NIH3T3 ćelije tretirane 10 μ M niraparibom i PARP-/- ćelije. Za svaku grupu zasejana su po tri stakalca.

Stakalca sa ćelijama prvo su isprana PBS puferom a zatim su ćelije fiksirane 2% PFA 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon fiksiranja, stakalca sa ćelijama su isprana PBS puferom, potom je izvršena permeabilizacija ćelija pomoću 0,25% deterdženta Triton X-100 rastvorenog u PBS puferu, na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min. Ćelije su isprane PBS puferom još tri puta po 5 min. Za uspešnu specifičnu detekciju hidrosimetilacije pomoću anti-5hmC antitela neophodno je denaturisati DNK pa su zato stakalca inkubirana u 2N HCl 30 min na 37°C a potom su tri puta isprana PBS puferom. Sprečavanje nespecifičnog vezivanja antitela postignuto je blokiranjem u 3% BSA u trajanju od 1 h. Nakon blokiranja stakalca su isprana sa PBST puferom za ispiranje koji je korišćen i za razblaživanje svih antitela. Stakalca su potom inkubirana preko noći na 4°C sa zečjim anti-5hmC antitelom (1:10000, Active Motif). Posle inkubacije i ispiranja puferom za ispiranje (pet puta po 3 min), stakalca sa ćelijama inkubirana su sa magarećim anti-zečjim Alexa Fluor 555 antitelom (1:400, Invitrogen) 2 h na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja (pet puta po 3 min), stakalca su isprana i u destilovanoj vodi a zatim su nakon dodavanja Mowiol reagensa postavljena na mikroskopske pločice. Ovako pripremljeni preparati, nakon sušenja, fotografisani su na Leica TCS SP5 II konfokalnom mikroskopu (ekscitacija laserom talasne dužine 543 nm). Kao kontrola nespecifičnog signala korišćena su stakalca sa ćelijama koja su prošla celu proceduru ali nisu inkubirana sa primarnim antitelom već sa puferom za ispiranje. Kod ovih preparata nije uočen značajan fluorescentni signal.

Analiza nivoa 5hmC urađena je pomoću Image J softvera. Za analizu je napisan makro koji je omogućio da se automatski selektuju pojedinačna jedra sa slika i da se za svako jedro izmeri jačina fluorescentnog signala izražena kao integrisana gustina signala (IntDen). Ovde je prikazan kod korišćenog makroa:

```
name = getTitle();
```

```

run("Duplicate...", " ");
dupl = getTitle();
selectWindow(name);
run("Subtract Background...", "rolling=50");
selectWindow(dupl);
run("Subtract Background...", "rolling=50");
run("Find Edges");
run("Gaussian Blur...", "sigma=3");
setAutoThreshold("Default dark");
setAutoThreshold("Yen dark");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=25-Infinity circularity=0.5-1.00 show=Ellipses
exclude include");
elips = getTitle();
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area mean standard modal min integrated median
display redirect=["+ name +"] decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=25-Infinity circularity=0.50-1.00
show=Overlay display exclude include");
dir = getDirectory("Choose the directory to save results to");
saveAs("Measurements", dir+name+"YenResults.csv");
run("Clear Results");
selectWindow(elips);
close();
selectWindow(dupl);
close();
selectWindow(name);

```


close());

Nakon kvantifikacije signala statistička analiza urađena je sa log₁₀ transformisanim vrednostima IntDen. Statistička značajnost ispitana je pomoću analize varijanse (ANOVA) praćene Tukey testom.

3.4. Tehnike za manipulaciju proteinskim uzorcima

3.4.1. Izolacija ćelijskih lizata

Lizati ćelija izolovani su ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent (Thermo Scientific) reagensom, prema uputstvu proizvođača. Kada su ćelije dostigle oko 80% konfluentnosti odlepljene su od podloge dodavanjem PBS pufera. Nakon 5 min centrifugiranja na 400 x g supernatant je uklonjen a talog ćelija je resuspendovan u ProteoJET reagensu kome je dodat koktel proteaznih inhibitora. Uzorci su inkubirani 30 min na ledu a nakon toga su centrifugirani 15 min na 16000 x g. Supernatant (ćeliski lizat) je alikvotiran i čuvan na -80°C do dalje upotrebe.

3.4.2. Taloženje proteina trihlorsirćetnom kiselinom

Proteini izlučeni iz NIH3T3 i PARP^{-/-} ćelija u medijum, izdvojeni su iz medijuma u kojem su ćelije gajene, precipitacijom pomoću 13% trihlorsirćetne kiseline (eng. *trichloroacetic acid*, TCA). Kada su ćelije dostigle oko 80% konfluentnosti kompletan medijum zamenjen je DMEM medijumom u koji nije dodat FBS. Nakon 24 h, medijum je pokupljen a izlučeni proteini istaloženi su inkubacijom uzoraka sa 13% TCA, na 4°C, u trajanju od 1 h. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 15 min na 16000 x g. Talog je ispran 70% etanolom a zatim je ponovljeno centrifugiranje 15 min na 16000 x g. Korak ispiranja ponovljen je dva puta a zatim je nakon uklanjanja etanola talog osušen i rastvoren u puferu za uzorke. Istaloženi proteini razdvojeni su tris-tricinskom SDS-PAGE elektroforezom nakon čega je imunoblot metodom detektovan CXCL12.

3.4.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracije proteina u lizatima izmerene su kolorimetrijskom Lowry metodom. U 5 µl svakog uzorka dodato je 195 µl vode i 1 ml rastvora koji je sadržao

0,01% CuSO₄, 0,02% K-Na-tartarata, 0,01 N NaOH, 2% Na₂CO₃. Uzorci su dobro promešani a zatim su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodato je po 100 µl razblaženog Folinovog reagensa i inkubacija je trajala 10 min na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je izmerena na spektrofotometru (Shimatzu UV-160) na 750 nm. Na osnovu apsorbance uzoraka BSA poznatih koncentracija konstruisana je standardana prava sa koje su određene koncentracije proteina u lizatima.

3.4.4. Elektroforetsko razdvajanje proteina

3.4.4.1. Tris-glicinska elektroforeza

Za razdvajanje proteina prema molekularnoj masi primenjena je jednodimenzionalna tris-glicinska SDS-PAGE elektroforeza.

Poliakrilamidni gel sastojao se iz donjeg gela za razdvajanje (7-16% PAA, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% amonijum-persulfat (AMPS) i 0,05% tetrametilendiamin (TEMED)) i gornjeg gela za skoncentrisavanje (4% PAA, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% AMPS i 0,1% TEMED). Elektroforeza je tekla u puferu za tris-glicinsku SDS-PAGE elektroforezu (0,192 M glicin, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3 i 0,1% SDS). Pre nanošenja na gel, uzorcima je dodat pufer za uzorke i uzorci su potom inkubirani u ključaloj vodi 5 min. Elektroforeza je trajala ukupno 1 h a uzorci proteina putovali su prvo kroz gel za skoncentrisavanje pri naponu od 120 V a zatim kroz gel za razdvajanje pri naponu od 150 V. Za elektroforezu korišćen je sistem Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad).

3.4.4.2. Tris-tricinska elektroforeza

Kako bi se detektovao CXCL12 protein male molekulske mase, istaložen iz medijuma u kom su gajene NIH3T3 i PARP-/- ćelije, primenjena je tris-tricinska SDS-PAGE elektroforeza.

Poliakrilamidni gel sastojao iz donjeg gela za razdvajanje (15% PAA, 3 M Tris-HCl, pH 8,45, 0,3% SDS, 16,67% glicerol, 0,05% AMPS i 0,05% TEMED) i gornjeg gela za skoncentrisavanje (4% PAA, 3 M Tris-HCl, pH 8,45, 0,3% SDS, 0,05% AMPS i 0,1% TEMED). Za tris-tricinsku SDS-PAGE elektroforezu korišćeni su anodni pufer (200 mM Tris-HCl, pH 8,9) i katodni pufer (100 mM Tris-HCl, 100 mM tricin i

0,1% SDS). Elektroforeza je trajala ukupno 2 h na 4°C a uzorci proteina putovali su prvo kroz gel za skoncentrisavanje pri naponu od 30 V a zatim kroz gel za razdvajanje pri naponu od 200 V. Za elektroforezu korišćen je sistem Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad).

3.4.5. Imunoblot analiza

Nakon razdvajanja jednodimenzionalnom SDS-PAGE elektroforezom, proteini su preneti na polivinildifluorid (PVDF) membranu pod uticajem konstantne struje na 30 V preko noći. Pre transfera, gel i membrana su inkubirani 30 min u hladnom puferu za transfer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicin, 0,02% SDS, 20% metanol) a zatim su složeni između filter papira i postavljeni u aparat za transfer (Bio-Rad). Po završetku ispravnost transfera proverena je bojenjem membrane Ponceau-S bojom.

Nakon uklanjanja boje ispiranjem membrane u TTBS puferu za ispiranje membrana je inkubirana u rastvoru 3% nemasnog mleka u TTBS puferu radi blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon toga, membrana je inkubirana sa primarnim antitelom preko noći na 4°C a narednog dana nakon ispiranja inkubirana je sa odgovarajućim sekundarnim antitelom 2 h na sobnoj temperaturi. U eksperimentima u okviru ove teze, za imunoblot analizu korišćena su sledeća primarna antitela: zečje anti-PARP-1 (1:1000, Santa Cruz, H-250), mišje anti-PAR (1:1000, Enzo Life Sciences, Inc.) , kozje anti-TET1 (1:250, Santa Cruz, C-13), zečje anti-TET2 (1:1000, Merck Millipore), zečje anti-GAPDH (1:1000, Santa Cruz, FL-335), zečje anti-CXCL12 (1:250, Santa Cruz, FL-93), mišje anti-HIS (1:2000, Roche). Korišćena su i odgovarajuća sekundarna HRP-konjugovana antitela: kozje anti-zečje (1:2000, Santa Cruz) , kozje anti-mišje (1:10000, GE Health care), magareće anti-kozje (1:2000, Santa Cruz). Vizualizacija proteina urađena je na filmu pomoću luminol reagensa (Santa Cruz Biotechnology).

3.4.6. Ko-imunoprecipitacija

Pre početka imunoprecipitacije pripremljene su agarozne kuglice kuplovane sa proteinom A/G (Santa Cruz) tako što su tri puta isprane hladnim puferom za imunoprecipitaciju (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM PMSF) uz centrifugiranje 1 min, 5000 x g na 4°C. Ćelijski lizati (300 µg) su

razblaženi hladnim puferom za imunoprecipitaciju kom je dodat koktel proteaznih inhibitora, a zatim su prešćeni inkubacijom sa pripremljenim kuglicama 1 h na 4°C uz konstantno rotiranje na rotacionoj platformi. Nakon centrifugiranja, 10 min, 10000 x g na 4°C, prečišćeni supernatant je prebačen u novu tubicu i dodato je 2 µg primarnog antitela. Za imunoprecipitaciju korišćena su: kozje anti-TET1 (Santa Cruz, C-13), zečje anti-TET2 (Merck Millipore) i zečje anti-PARP-1 (Santa Cruz, H-250) antitela. Nakon inkubacije na rotacionoj platformi preko noći na 4°C, dodate su pripremljene kuglice i rotiranje na 4°C nastavljeno je još 4 h. Posle inkubacije uzorci su centrifugirani i isprani pet puta puferom za imunoprecipitaciju kome je dodat koktel proteaznih inhibitora. Imunoprecipitovani proteini eluirani su inkubiranjem kuglica u puferu za uzorke (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 100 mM ditiotritol, 0.02% bromofenol plavo) u ključaloj vodi u trajanju od 5 min. Nakon toga usledilo je centrifugiranje 10 min, 10000 x g na sobnoj temperaturi i odvajanje supernatanta koji sadrži odgovarajuće imunoprecipitate. Imunoprecipitovani proteini analizirani su imunoblot metodom kojoj je prethodilo razdvajanje proteina tris-glicinskom SDS-PAGE elektroforezom u 7% PAA gelu i prenošenje proteina sa gela na PVDF membranu. Imunoblot metodom vizualizovani su imunoprecipitovani i koimunoprecipitovani proteini korišćenjem kozjeg anti-TET1 (Santa Cruz, C-13), zečjeg anti-TET2 (Merck Millipore) i zečjeg anti-PARP-1 (Santa Cruz, H-250) antitela.

3.4.7. Esej PARP aktivnosti

Određivanje PARP aktivnosti u lizatima kontrolnih NIH3T3 ćelija, tretiranih NIH3T3 ćelija (0,1% DMSO ili 10 µM niraparib) i PARP^{-/-} ćelija korišćen je komercijalni kolorimetrijski set PARP Universal Colorimetric Assay Kit (Trevigen) prema uputstvu proizvođača. Svi rastvori pripremljeni su prema uputstvu proizvođača. Esej se izvodi na sobnoj temperaturi. Bunarići obloženim histonima pripremljeni su za esej rehidracijom histona u odgovarajućem puferu iz seta tokom 30 min. Zapremina lizata koja sadrži 40µg proteina dopunjena je do 25 µl PARP puferom i uzorci su dodati u isprane bunariće. Nakon 10 min inkubacije dodat je PARP koktel koji sadrži biotinirovani NAD i inkubacija je trajala 60 min. Posle ispiranja u bunariće je dodat razblaženi streptavidin-HRP uz inkubaciju od 20 min a zatim je posle ispiranja dodat TACS-Sapphire reagens. Reakcija je zaustavljena nakon 15 min dodavanjem 0.2 M

HCl. Apsorbanca je izmerena na 450 nm pomoću ELISA čitača. Eksperiment je nezavisno ponovljen tri puta.

Statistička značajnost ispitana je ANOVA analizom sa blokovima, gde je set rezultata svih grupa jednog nezavisnog eksperimenta predstavljao blok. Rezultat svake eksperimentalne grupe upoređen je sa rezultatima kontrolne grupe NIH3T3 ćelija pomoću Dunnett testa.

3.5. Tehnike za manipulaciju nukleinskim kiselinama

3.5.1. Izolacija genomske DNK

Za izolaciju genomska DNK ćelije su resuspendovane u modifikovanom Bredli puferu (2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) u koji je dodata proteinaza K. Ćelije su u ovom puferu inkubirane na 55°C preko noći. Narednog dana uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi a zatim im je dodat hladni apsolutni etanol sa 75 mM Na-acetatom i uzorci su promešani. Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi DNK je staložena centrifugiranjem 5 min na 5000 x g. Talog DNK inkubiran je 1 h u hladnom 70% etanolu. Ovaj korak ispiranja ponovljen je ukupno dva puta nakon čega je talog DNK osušen i rastvoren u vodi. Uzorci su čuvani na -20°C. Koncentracija i čistoća proverene su na NanoPhotometer N60 (Implen) spektrofotometru.

3.5.2. Izolacija totalne RNK

Za izolaciju totalne RNK korišćen je set GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) prema uputstvu proizvođača. Ćelije su odlepljene dodavanjem PBS pufera koji je uklonjen nakon centrifugiranja 5 min na 400 x g. Talog ćelija resuspendovan je u puferu za lizu kome je dodat β-merkptoetanol finalne koncentracije 0,286 M. Ćelije su homogenizovane a zatim je dodat 96% etanol i svi uzorci su promešani i prebačeni na kolonu za prečišćavanje. Nakon centrifugiranja 1 min na 13000 x g filtrat je uklonjen a kolona je isprana odgovarajućim puferima iz seta. Kako bi se eluirala RNK na kolonu je naneta voda i kolona je centrifugirana 1 min na 13000 x g. Koncentracija i čistoća eluirane RNK proverene su na NanoPhotometer N60 (Implen) spektrofotometru.

3.5.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

Ekspresija gena analizirana je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (eng. *real-time quantitative polymerase chain reaction* RT-qPCR). Priprema RNK za ovu analizu podrazumevala je uklanjanje zaostale DNK i reverznu transkripciju RNK. Izolovana totalna RNK (1 µg) inkubirana je 30 min na 37°C sa 1 U DNKaze I (Thermo Scientific) u puferu koji je sadržao MgCl₂. Reakcija je zaustavljena inkubacijom sa EDTA 10 min na 65°C. Za reverznu transkripciju RNK korišćen je RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit set (Thermo Scientific). Uzorcima RNK koji su tretirani DNKazom (1 µg) dodati su oligo-dT i nasumični heksmerni prajmeri, odgovarajući pufer, 20 U inhibitora RNKaze, dNTP i 200 U reverzne transkriptaze. Reakcija je inkubirana 5 min na 25°C, zatim 1 h na 42°C a zaustavljena je inkubiranjem 5 min na 70°C. Reverzno transkribovana RNK čuvana je na -20°C.

Reakcije za PCR pripremane su u finalnoj zapremini od 10 µl i sadržale su 50 ng reverzno transkribovane RNK, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) reagens i 1 µM prajmere. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix sadrži DNK polimerazu, dNTP, SYBR green I fluorescentnu interkalirajuću boju i odgovarajući pufer. Reakcije su se odvijale kroz sledeće faze: inicijalna denaturacija 10 min na 95°C i 40 ciklusa sa 15 s denaturacije na 95°C praćenih vezivanjem prajmera i elongacijom 60 s na 60°C. Za RT-qPCR reakcije korišćen je QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) aparat i QuantStudio Design & Analysis softver.

Relativna ekspresija ciljnih gena izračunata je spram interne kontrole (*Gapdh*) pomoću delta Ct metode ($2^{\Delta Ct}$), gde je ΔCt razlika između Ct vrednosti za ciljni gen i *Gapdh* gen (za *Gapdh* su korišćeni prajmeri iz seta RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit set). Svi eksperimenti nezavisno su ponovljeni tri puta. Statistička analiza urađena je na log₂ transformisanim podacima. Za poređenje dve grupe korišćen je t-test uparenih uzoraka, sparivanjem uzoraka izolovanih u istom danu. Za poređenje više od dve grupe urađen je ANOVA test nakon čega su rezultati svake grupe upoređeni sa rezultatima kontrolne grupe NIH3T3 ćelija pomoću Dunnett testa.

Za dizajn prajmera (Tabela 3.1) korišćen je web alat Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) i mišje sekvence pohranjene u GenBank bazi. Identifikacioni brojevi sekvenci ciljnih gena su : *Dnmt1* - NC_000075.6 (20907206..20959888, complement), *Dnmt3a* - NC_000078.6 (3804986..3914443),

Dnmt3b - NC_000068.7 (153649165..153687730), *Tet1* - NC_000076.6 (62804570..62887581, complement), *Tet2* - NC_000069.6 (133463677..133545196, complement), *Cxcl12* - NC_000072.6 (117168535..117181368).

3.5.4. Metode za analizu metilacije DNK bazirane na PCR tehnici – MSP i HRM

3.5.4.1. Bisulfitna konverzija DNK

Kako bi se metilacija DNK analizirala metodama baziranim na PCR tehnici uzorci su najpre podvrgnuti bisulfitnoj konverziji sa komercijalnim setom EZ-DNA methylation kit (Zymo Research). Bisulfitna konverzija dovodi do prevođenja nemetilovanog C u uracil (koji je nakon PCR umnožavanja zamenjen T) dok metilovani C ostaje neizmenjen, što omogućava razlikovanje metilovane i nemetilovane varijante istog regiona DNK na osnovu razlike u sekvencama. Procedura bisulfitne konverzije započinje denaturacijom 800 ng DNK inkubiranjem u puferu za razblaživanje 15 min na 37°C. Nakon toga, uzorci su inkubirani sa CT reagensom za konverziju 12-16 h na 50°C a nakon toga su ohlađeni na ledu 10 min. U sledećem koraku uzorci su izmešani sa puferom za vezivanje kako bi se nakon centrifugiranja (30 s na 13000 x g) na Zymo-Spin IC koloni DNK vezala za kolonu. Nakon ispiranja, DNK vezana za kolonu inkubirana je u puferu za desulfonaciju 15-20 min na sobnoj temperaturi, a zatim je nakon dva ispiranja DNK eluirana sa kolone centrifugiranjem (30 s na 16000 x g) u 13 µl pufera za eluciju.

3.5.4.2. Dizajniranje prajmera specifičnih za bisulfitno konvertovanu DNK

Pozicija CpG ostrvca u okviru *Cxcl12* gena određena je analiziranjem sekvence ovog gena (GenBank identifikacioni broj NC_000072.6) kojoj je pridodato 2000 baznih parova uzvodno od mesta početka transkripcije (eng. *transcription start site*, TSS) pomoću bioinformatičkog alata EMBOSS Cpgplot (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) sa standardnim parametrima (obs/exp preko 0,6, %C+G preko 50% i minimalna dužina 200 baznih parova). Za analizu metilacije DNK dizajnirana su četiri seta prajmera, u okviru detektovanog CpG ostrvca, pomoću MethPrimer bioinformatičkog alata

(<http://www.urogene.org/methprimer2/>). Prajmeri (Tabela 3.1) su dizajnirani da obuhvataju četiri regiona: deo promotora (1MU), TSS, egzon-intron granicu (2MU) i deo prvog introna (3MU). Svaki set prajmera sastojao se od dva para prajmera, jednog para specifičnog za metilovanu (M) i drugog specifičnog za nemetilovanu (U) bisulfitno konvertovanu DNK. Isti prajmeri korišćeni su i za metilaciono specifičan PCR (eng. *methylation specific PCR*, MSP) i za analizu krive topljenja visoke rezolucije (eng. *high resolution melting analysis*, HRM). Za MSP svaki par prajmera korišćen je za zasebnu reakciju dok su za HRM u istu reakciju dodati i M i U par prajmera istog seta, kako bi se obuhvatile sve moguće kombinacije metilacionog statusa.

3.5.4.3. MSP i HRM reakcije i analiza podataka

Reakcije za MSP sadržale su Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 2 μ M prajmere i 60 ng bisulfitno konvertovane DNK u finalnoj zapremini od 10 μ l. Reakcije za HRM sadržale su MeltDoctor HRM Master Mix (Applied Biosystems), 0.15 μ M prajmere i 10 ng bisulfitno konvertovane DNK u finalnoj zapremini od 10 μ l. Za 1MU, 2MU i 3MU setove prajmera amplifikacija se odvijala kroz sledeće faze: inicijalna denaturacija 10 min na 95°C i 40 ciklusa sa 15 s denaturacije na 95°C praćenih vezivanjem prajmera i elongacijom 60 s na 58°C. Za TSS set prajmera korišćen je tzv. touchdown pristup koji podrazumeva postepeno snižavanje temperature vezivanja prajmera. Inicijalna denaturacija trajala je 10 min na 95°C a zatim su svi ciklusi započinjali sa 30 s denaturacije na 95°C i završavali se sa 60 s elongacije na 72°C dok je temperatura vezivanja prajmera postepeno snižavana, tako da je u prvih 5 ciklusa bila 61°C, narednih 5 ciklusa 58°C i finalnih 35 ciklusa 55°C. Za HRM analizu, posle amplifikacije, dodat je korak krive topljenja amplikona tako što je temperatura podizana od 60-90°C brzinom od 0.025°C/s sa merenjem fluorescence nakon svakog porasta temperature. Za MSP i HRM reakcije korišćen je QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) aparat i QuantStudio Design & Analysis softver. Za analizu HRM rezultata korišćen je HRM Software v3.1 (Applied Biosystems).

Analiza MSP podataka zasnivala se na Ct vrednostima dobijenim za reakcije sa M i U parom prajmera istog seta na osnovu kojih je izračunat relativni nivo metilacije DNK izražen kao indeks metilacije (Akirav i sar., 2011). Za računanje indeksa metilacije korišćena je sledeća formula: $2^{(Ct \text{ za reakciju U para prajmera}) - (Ct \text{ za reakciju M para prajmera})}$.

Svi eksperimenti nezavisno su ponovljeni tri puta. Statistička analiza urađena je na log₂ transformisanim podacima pomoću t-testa uparenih uzoraka, sparivanjem uzoraka izolovanih u istom danu. Analizom krivih topljenja dobijenih u HRM analizi određene su temperature topljenja na osnovu kojih su poređeni nivoi metilacije ciljnih regiona *Cxcl12* gena kod različitih uzoraka.

3.5.5. Imunoprecipitacija hromatina

Imunoprecipitacija hromatina (eng. *chromatin immunoprecipitation*, ChIP) izvedena je pomoću komercijalnog seta Pierce Magnetic ChIP Kit (Thermo Scientific) prema uputstvu proizvođača. Čelije su gajene u Petri šoljama do dostizanja 80% konfluentnosti kada su fiksirane 10 min na sobnoj temperaturi sa 1% formaldehidom, radi učvršćivanja (eng. *cross-linking*) protein-protein i protein-DNK veza. Nakon ispiranja PBS puferom fiksiranje je zaustavljeno dodavanjem rastvora glicina u kojem su ćelije inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim su, nakon ispiranja hladnim PBS puferom, ćelije odlepljene od podloge dodavanjem PBS pufera kome je dodat koktel proteaznih inhibitora. Čelije su istaložene centrifugiranjem 5 min na 3000 x g na 4°C a zatim su resuspendovane u puferu za ekstrakciju membrane i inkubirane 10 min na ledu. Posle centrifugiranja 3 min na 9000 x g na 4°C, istaložena jedra inkubirana su sa mikrokokalnom nukleazom (0,005 U/μL) 15 min na 37°C a zatim su uzorci sonifikovani (sedam ciklusa - 20 s sonifikacije i 30 s pauze) kako bi se fragmentisala DNK i razbila jedarna membrana. Uzorci su zatim imunoprecipitovani preko noći na rotacionoj platformi na 4°C sa kontrolnim antitelima anti-RNK polimeraza II (RNK pol II) ili normalnim zečjim IgG antitelom (koja su deo Pierce Magnetic ChIP Kit seta) ili sa 5 μg zečjeg anti-TET1 (Millipore Merck) ili 5 μg zečjeg anti-TET2 (Millipore Merck) antitela. Nakon toga, imunoprecipitatima su dodate magnetne kuglice kuplovane sa proteinom A/G i inkubacija je trajala 2 h na 4°C na rotacionoj platformi. Nakon ispiranja, kuglicama je dodat pufer za eluciju i imunoprecipitati su inkubirani 30 min na 65°C uz konstantno mešanje u termomikseru. Eluirani imunoprecipitati i kontrolni uzorak koji je sadržao 10% početne količine hromatina (i nije imunoprecipitovan) su tretirani sa proteinazom 1,5 h na 65°C. Nakon toga DNK je prečišćena na koloni i dalje je korišćena za RT-qPCR kako bi se procenila relativna zastupljenost ciljne sekvence u imunoprecipitatima. Reakcije za RT qPCR su pripremane u finalnoj zapremini od 10 μl

i sadržale su uzorke imunoprecipitovane DNK ili kontrolne uzorke 10% početne količine DNK, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) reagens i 1 μ M prajmere.

Za RT-qPCR dizajniran je par prajmera koji je obuhvatao deo promotora *Cxcl12* neposredno uz TSS (Tabela 3.1). Zastupljenost ove sekvence u imunoprecipitatima određena je na osnovu standardne prave konstruisane pomoću RT-qPCR podataka dobijenih za seriju razblaženja kontrolnih uzoraka (NIH3T3 i PARP-/-) koji su sadržali 10% početne količine DNK i nisu podvrgnuti imunoprecipitaciji. Izračunata zastupljenost ciljne sekvence u imunoprecipitatima različitih antitela normalizovana je spram zastupljenosti u imunoprecipitatu IgG antitela. Na kraju je zastupljenost ciljne sekvence u uzorcima imunoprecipitovanim iz PARP-/- ćelija izražena u odnosu na zastupljenost u NIH3T3 uzorku imunoprecipitovanom istim antitelom. Eksperiment je nezavisno ponavljen dva puta.

Tabela 3.1. Sekvence prajmera korišćenih za PCR.

Naziv		Sekvenca 5'-3'	
RT-qPCR prajmeri			
Cxcl12	fw	TTCTTCGAGAGCCACATCGC	
	rev	TTTCGGGTCAATGCACACTT	
MSP prajmeri			
1MU	1M	fw	TTAGTATTTAGCGGAGTCGC
		rev	TATAACTAAAATCTCTAACGCGCA
	1U	fw	AGTATTTAGTGGAGTTGTGGA
		rev	ACCTAAAATATAACTAAAATCTCTAACACA
TSS	TSS-M	fw	GTTTTAGAGGCGAAAATTAGGC
		rev	AAAAAACGACTACTCCGCAA
	TSS-U	fw	GTTTTAGAGGTGAAAATTAGGT
		rev	AAAAACAACACTACTCCACAA
2MU	2M	fw	GGTCGCGTTTTGTATTAGTGAC
		rev	TACAAAATAAACTACCCCAAATTCG
	2U	fw	TTGGTTGTTTTTGTATTAGTGATG
		rev	AAAATAAACTACCCCAAATTCACT
3MU	3M	fw	TTATTTTGTAGGGCGTATTTTTATC
		rev	ACCCTCTCTAAATCCTATAACCG
	3U	fw	ATTTTGTAGGGTGTATTTTTATTGG
		rev	CAACCCTCTCTAAATCCTATAACCCAC
ChIP prajmeri			
Cxcl12 promoter	fw	AGGTAGGGAAGTGAAGGGC	
	rev	CGCTGGGCGCTTTAGAGG	

3.5.6. 5mC ELISA esej

Globalni nivo metilacije DNK izmeren je u kontrolnim NIH3T3 ćelijama, NIH3T3 ćelijama tretiranim 0,1% DMSO i 10 μ M niraparibom kao i u PARP-/- ćelijama, pomoću komercijalnog set 5-mC DNA ELISA Kit (Zymo Research) prema uputstvu proizvođača. Esej je baziran na ELISA metodi i koristi posebno monoklonalno anti-5mC antitelo visoke specifičnosti i osetljivosti. Prvo je denaturisano po 100 ng genomske DNK iz navedenih ćelija kao i DNK satandarda napravljenih mešanjem nemetilovane i metilovane kontrolne DNK u različitim odosima (koje su deo seta 5-mC DNA ELISA Kit). Bunarići su obloženi denaturisanom DNK kojoj je dodat pufer za oblaganje. Nakon 1 h inkubacije i ispiranja ELISA puferom dodat je miks anti-5mC i HRP-konjugovanog sekundarnog antitela. Bunarići su zatim prekriveni folijom i inkubirani 1 h na 37°C. Posle ispiranja u bunariće je dodat HRP razvijatelj i inkubacija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je izmerena na 450 nm pomoću ELISA čitača. Eksperiment je nezavisno ponovljen tri puta

Na osnovu apsorbance izmerene za standarde aproksimirana je kalibraciona kriva preko jednačine logaritamske regresije drugog reda, na osnovu koje je izračunat procenat 5mC kod ispitivanih uzoraka. Statistička značajnost ispitana je ANOVA analizom sa blokovima, gde je set rezultat svih grupa jednog nezavisnog eksperimenta predstavljao blok. Rezultat svake eksperimentalne grupe upoređen je sa rezultatima kontrolne grupe NIH3T3 ćelija pomoću Dunnett testa.

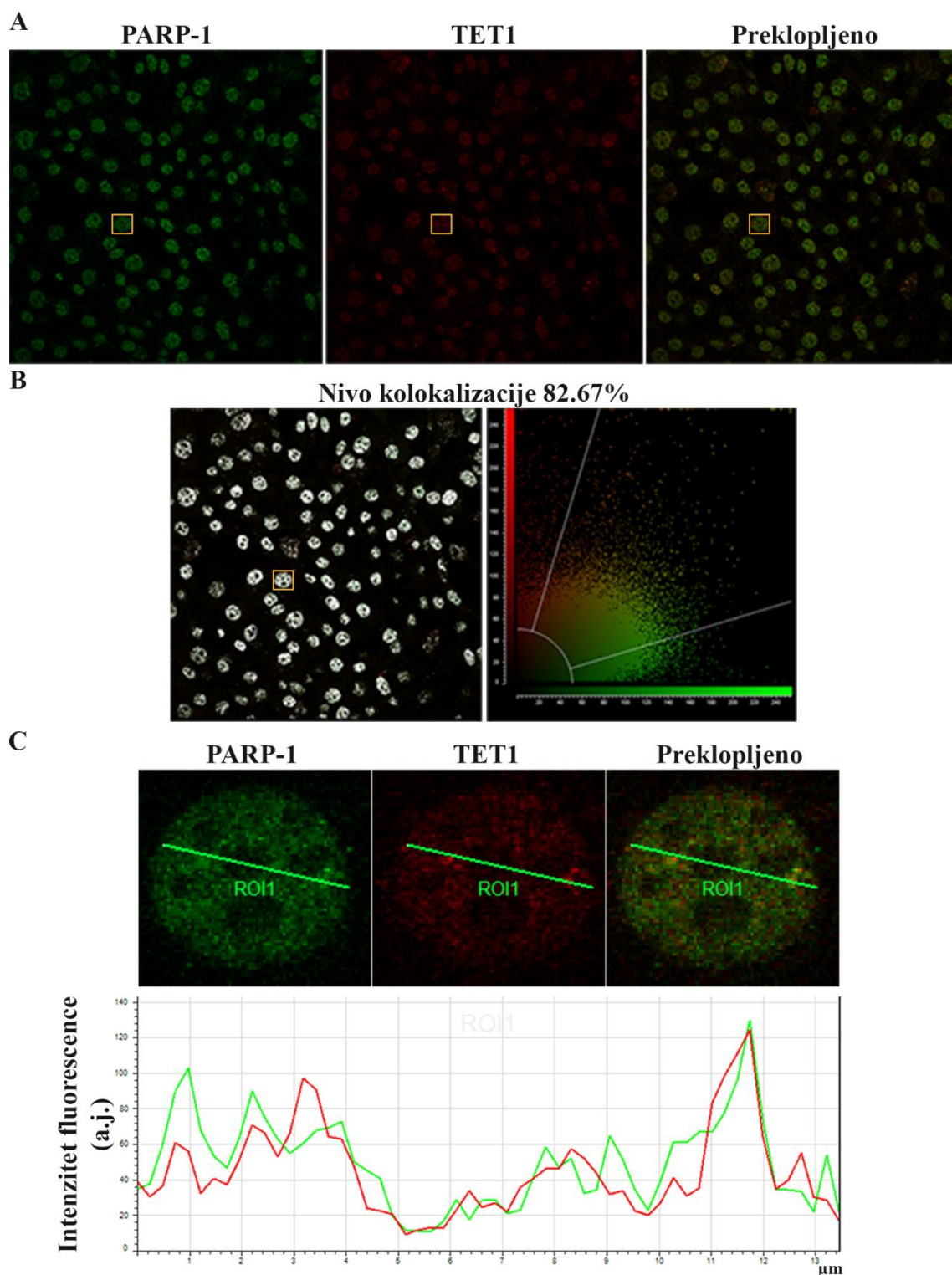
4. REZULTATI

4.1. Međusobna povezanost TET1 i PARP-1 proteina i uticaj na aktivnost TET1

Prvi cilj ove disertacije odnosio se na ispitivanje međusobne povezanosti TET1 proteina sa PARP-1 i PAR polimerima. Shodno tome, prvi set eksperimenata bio je usmeren ka ispitivanju kolokalizacije i međusobnih interakcija TET1 i PARP-1 proteina koristeći *in cellulo* pristup. U drugom setu eksperimenata analiziran je uticaj PARP-1 enzima na TET1 *in vitro*. Najpre je provereno da li je TET1 podložan PARilaciji kao i nekovalentnoj interakciji sa PAR polimerima. Nakon toga pristupilo se ispitivanju uticaja aktivnosti PARP-1 enzima na kinetiku TET1-posredovane oksidacije 5-metilcitozina što je bio sledeći cilj ove doktorske disertacije.

4.1.1. Kolokalizacija TET1 i PARP-1 proteina *in cellulo*

Za ispitivanje subćelijske kolokalizacije TET1 i PARP-1 imunocitohemijskom metodom, korišćena su primarna antitela - zečje anti-TET1, pacovsko anti-PARP-1 i odgovarajuća sekundarna antitela obeležena fluorescentnim bojama - kozje anti-zečije Alexa Fluor 647 (crvena fluorescenca) i anti-pacovsko FITC (zelena fluorescenca) antitelo. Konfokalnom mikroskopijom dvojno fluorescentno obeleženih NIH3T3 ćelija, utvrđeno je da proteini TET1 (obeleženi crveno) i PARP-1 (obeleženi zeleno) kolokalizuju u jedru (Slika 4.1). Na osnovu prikazanih pragova za pozadinu kao i za zeleni i crveni signal utvrđen je nivo kolokalizacije od 82,67% na preko 100 ćelija u vidnom polju (Slika 4.1A, 4.1B). Tačke kolokalizacije označene su belom bojom na Slici 1B radi lakšeg uočavanja. Osim toga, na primeru jedne izdvojene ćelije može se videti da, duž nasumično izabrane linije, signali crvenog i zelenog kanala prate vrlo sličan profil (Slika 4.1C), dodatno potvrđujući kolokalizaciju TET1 i PARP-1 proteina.

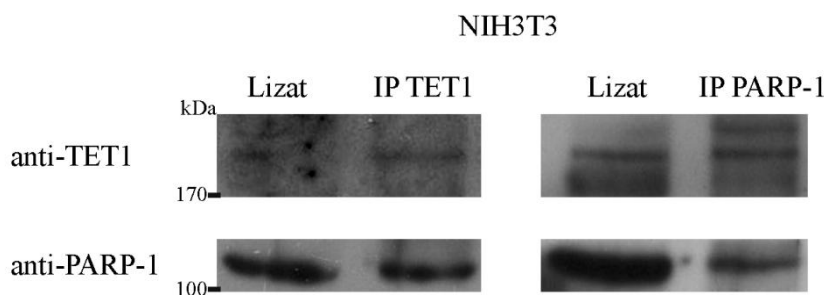


Slika 4.1. Kolokalizacija TET1 i PARP-1 proteina u NIH3T3 ćelijama. **(A)** Reprezentativne slike sa konfokalnog mikroskopa dobijene nakon imunocitohemijskog bojenja NIH3T3 ćelija, sa imunofluorescentnim antitelima na PARP-1 (zelena boja) i TET1 (crvena boja). **(B)** Tačke kolokalizacije u ćeliji istaknute su belom bojom. Nivo kolokalizacije određen na osnovu postavljenih pragova za pozadinu kao i za crveni i zeleni signal prikazanih na grafiku intenziteta crvenog (y-osa) i zelenog (x-osa) signala. **(C)** Primer kolokalizacije u izdvojenoj ćeliji

(uokvirena narandžastim kvadratom na slikama pod A i B) duž zelene linije (ROI1) i grafik intenziteta fluorescence crvenog i zelenog signala duž obeležene linije. a.j. - arbitrarne jedinice.

4.1.2. Interakcija TET1 i PARP-1 proteina *in cellulo*

Pokazana kolokalizacija TET1 i PARP-1 ukazuje na to da se ovi proteini nalaze na vrlo bliskim pozicijama u jedru što upućuje na mogućnost njihove međusobne fizičke interakcije. Kako bi se utvrdilo da li zaista dolazi do TET1 - PARP-1 interakcije *in cellulo* koristila se metoda ko-immunoprecipitacije. TET1 i PARP-1 proteini imunoprecipitovani su iz lizata NIH3T3 ćelija sa odgovarajućim (anti-TET1 i anti-PARP-1) antitelima. Imunoblot metodom (Slika 4.2) dobijenih imunoprecipitata (korišćenjem anti-TET1 i anti-PARP-1 antitela), najpre je potvrđeno prisustvo proteina koji su precipitovani što je ukazalo na efikasnost imunoprecipitacija. Takođe, pokazano je da sa TET1 proteinom koprecipituje i PARP-1, kao i suprotno, u imunoprecipitaciji PARP-1 proteina detektovan je koprecipitovan TET1. Sveukupno ovi rezultati jasno pokazuju da postoji direktna ili indirektna interakcija ova dva proteina *in cellulo*.

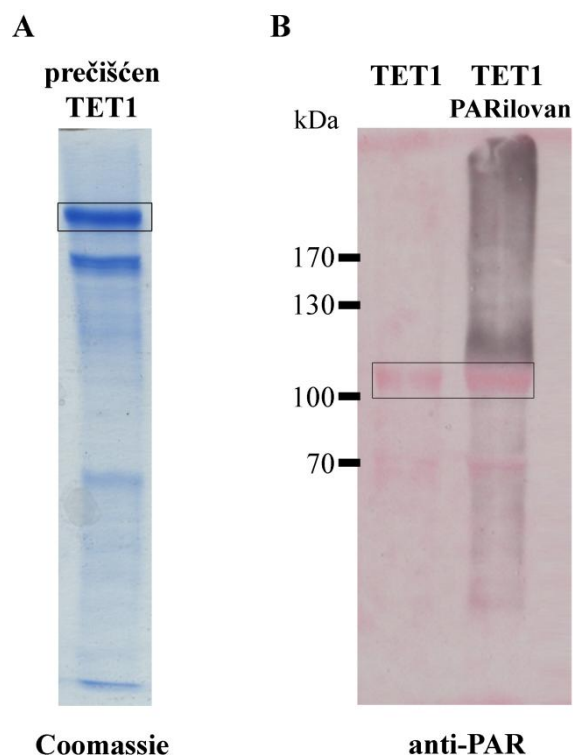


Slika 4.2. Ko-immunoprecipitacija TET1 i PARP-1 proteina iz lizata NIH3T3 ćelija. Imunoblot analiza prisustva TET1 i PARP-1 proteina u imunoprecipitatima korišćenjem anti-TET1 i anti-PARP-1 antitela. IP – imunoprecipitat.

4.1.3. PARilacija TET1 od strane PARP-1 proteina *in vitro*

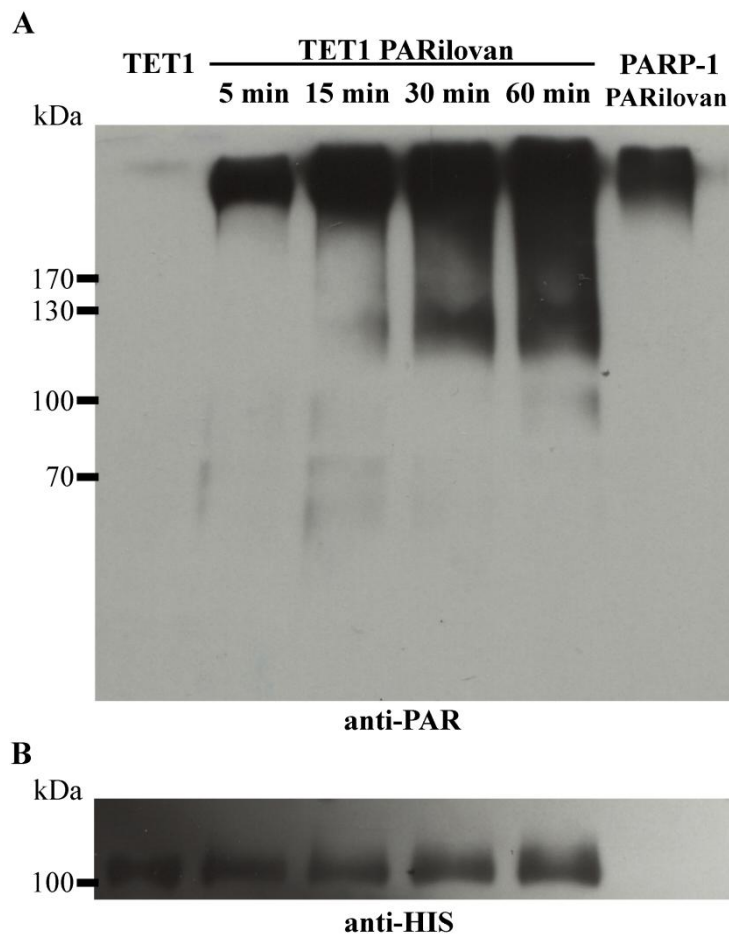
Interakcija PARP proteina sa ciljnim proteinima preduslov je za njihovu PARilaciju. Upravo zato je ustanovljena interakcija između TET1 i PARP-1 ukazala na mogućnost kovalentne modifikacije TET1 proteina PAR polimerima. Da bi se proverilo da li TET1 može biti PARilovan od strane PARP-1 urađeni su *in vitro* eksperimenti. Prvo je, iz kulture bakterija, prečišćen rekombinantni, histidinom obeležen, katalitički domen mišjeg TET1 proteina (Slika 4.3A). Prečišćeni TET1 je zatim podvrgnut reakciji

in vitro PARilacije uz pomoć komercijalnog rekombinantnog humanog PARP-1 proteina. Uspešnost PARilacije proverena je imunoblot analizom sa anti-PAR antitelom. Primećen je PAR signal (koji se razvlači) od pozicije (katalitičkog domena) rekombinantnog TET1 proteina, do vrha membrane (Slika 4.3B, Slika 4.4A). Iako u imunoblot analizi najčešće očekujemo detekciju konkretnih traka na određenim pozicijama u zavisnosti od veličine ciljnih proteina, kod PARilacije se često javlja razvučeni signal duž trake kojom su se kretali proteini tokom elektroforeze, iznad očekivane velične nemodifikovanog proteina. Objašnjenje ovakvog izgleda PAR signala je u tome što se na pojedinačnim molekulima ciljnog proteina nalaze kovalentno zakačeni negativno naelektrisani PAR polimeri različite dužine i razgranatosti što dalje utiče na kretanje modifikovanih proteina tokom elektroforeze (Di Giammartino i sar., 2013; Hossain i sar., 2009). Kako su pojedinačni molekuli proteina modifikovani u različitoj meri, očekivano je da se po završetku elektroforeze zaustavljaju na različitim pozicijama, najčešće iznad pozicije nemodifikovanog proteina, što za posledicu ima razvlačenje signala ka vrhu membrane.



Slika 4.3. *In vitro* PARilacija TET1 od strane PARP-1 proteina. **(A)** Prečišćen rekombinantni katalitički domen mišjeg TET1 proteina. **(B)** Preklapljeni slika membrane bojene Ponceau-S bojom sa slikom filma nakon imunoblot detekcije PAR polimera. Vizualizovani su: nemodifikovani katalitički domen TET1 i *in vitro* PARilovani katalitički domen TET1. Pravougaonim okvirom označena je pozicija nemodifikovanog katalitičkog domena TET1.

Takođe, treba napomenuti da deo PAR signala uvek potiče i od PARilacije samog PARP-1 koji ima visok afinitet ka automodifikaciji, ali je taj signal najčešće skoncentrisan na najvišim pozicijama (Hossain i sar., 2009) što se vidi i na Slici 4.4A. Na osnovu poređenja sa kontrolnom reakcijom u kojoj je samo PARP-1 PARilovan možemo pretpostaviti da sav signal, koji se u ostalim reakcijama nalazi između pozicija nemodifikovanog TET1 i automodifikovanog PARP-1, pripada uspešno *in vitro* PARilovanom TET1 proteinu (Slika 4.4A). Kako je samo rekombinantni TET1 obeležen histidinom dodatna provera PARilacije TET1 urađena je imunoblot metodom pomoću anti-HIS antitela gde je takođe primećeno blago razvlačenje signala ka većim molekulskim težinama (Slika 4.4B). Osim toga, na Slici 4.4 vidi se da sa produžavanjem trajanja *in vitro* PARilacije (5 min, 15 min, 30 min i 60 min), progresivno raste signal PARilovanog TET1 vizualizovanog kako anti-PAR (4.4A) tako i anti-HIS antitelom (4.4B), što je u skladu sa očekivanjima.

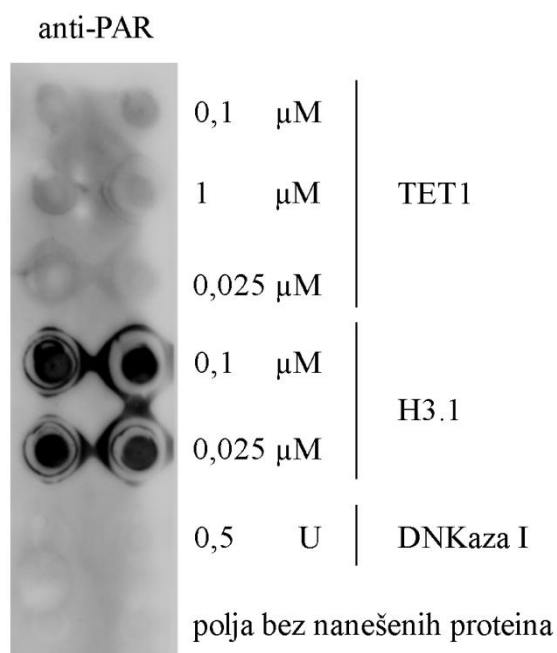


Slika 4.4. Kinetika *in vitro* PARilacije TET1 od strane PARP-1 proteina. *In vitro* PARilacija TET1 vizualizovana je imunoblot metodom pomoću (A) anti-PAR i (B) anti-HIS antitela. Kontrolni uzorci - nemodifikovani TET1 (negativna kontrola) i *in vitro* auto-PARilovani PARP-1 (pozitivna kontrola).

4.1.4. Nekovalentna interakcija TET1 proteina i slobodnih PAR polimera *in vitro*

Pored toga što brojni proteini mogu biti kovalentno modifikovani PAR polimerima neki proteini imaju sposobnost i nekovalentne interakcije sa PAR polimerima pa je ova mogućnost proverena i za TET1. Dot-blot metodom pokazano je da rekombinantni katalitički domen mišjeg TET1 proteina ima sposobnost nekovalentnog vezivanja slobodnih PAR polimera (Slika 4.5). Naime, TET1 i kontrolni proteini nanešeni su na membranu koja je inkubirana u rastvoru slobodnih PAR polimera što je dalo proteinima mogućnost da se nekovalentno vežu za njih. Nakon inkubacije i ispiranja urađena je imunoblot analiza sa anti-PAR antitelom kako bi se

detektovali vezani PAR polimeri. Signal je uočen na svim poljima na kojima su nanete različite koncentracije TET1 proteina, potvrđujući da TET1 katalitički domen može vezati PAR polimere. Iako se jači signal javio kod pozitivne kontrole, histona H3.1, jasno se vidi i signal na pozicijama TET1 proteina. Razlike u intenzitetu signala potencijalno ukazuju na niži afinitet TET1 katalitičkog domena prema PAR polimerima u odnosu na H3.1. Kao negativna kontrola nanešen je protein DNaza I za koji se ne očekuje interakcija sa PAR polimerima i koji nije dao signal u ovoj analizi. Signal je odsutan i na poljima na kojima nisu nanešeni proteini.

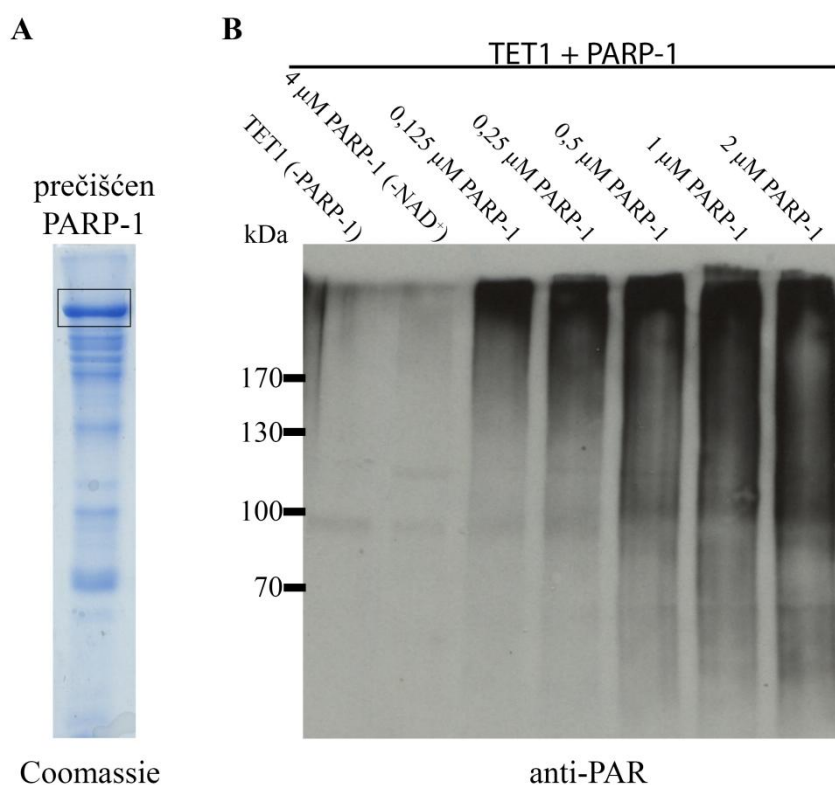


Slika 4.5. Dot-blot analiza nekovalentne interakcije TET1 sa slobodnim PAR polimerima *in vitro*. Imunoblot analizom sa anti-PAR antitelom detektovani su PAR polimeri u uzorcima sa rastućim koncentracijama TET1. Kontrolni uzorci – DNKaza I (negativna kontrola) i H3.1 (pozitivna kontrola).

4.1.5. Uticaj PARP-1-zavisne PARilacije na kinetiku aktivnosti TET1 proteina *in vitro*

Kako je pokazano da TET1 podleže *in vitro* PARilaciji, sledeći korak bio je da se ispita efekat ove modifikacije na katalitičku aktivnost TET1. Komercijalni rekombinantni PARP-1, koji je korišćen u eksperimentu *in vitro* PARilacije nije bio pogodan za ispitivanje aktivnosti TET1 zato što je pufer u kom je rastvoren sadržao supstance koje bi same mogle da inhibiraju aktivnost TET1. Zbog toga je, iz kulture

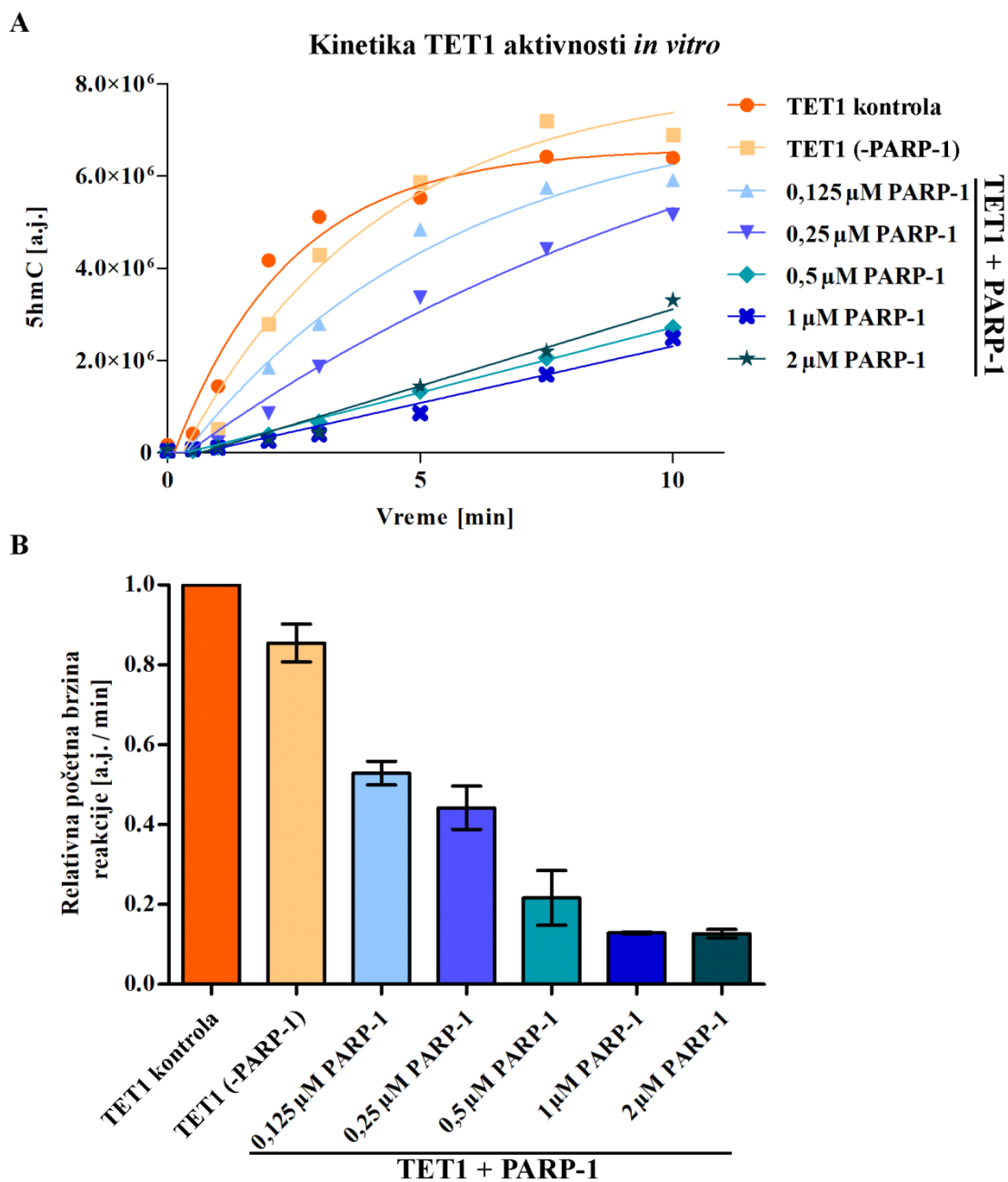
bakterija, prečišćen rekombinantni, histidinom obeležen, mišji PARP-1 protein (Slika 4.6A). Zatim je proverena njegova sposobnost da *in vitro* PARiluje TET1 u uslovima koji su potom korišćeni i za proveru aktivnosti TET1 proteina. Na slici 4.6B vidi se da je do PARilacije došlo u svim reakcijama izuzev u onima u kojima nije dodat NAD^+ ili PARP-1, što potvrđuje specifičnost detektovanog PAR signala. Korišćenjem rastućih koncentracija PARP-1 proteina postignut je progresivan porast nivoa PARilacije TET1 bez produžavanja trajanja reakcije kako bi se izbegle duge inkubacije koje bi mogle narušiti aktivnost TET1.



Slika 4.6. *In vitro* PARilacija TET1 prečišćenim rekombinantnim mišjim PARP-1 proteinom. (A) Prečišćen rekombinantni mišji PARP-1 protein. (B) *In vitro* PARilacija TET1 sa različitim koncentracijama prečišćenog PARP-1, detektovana imunoblot analizom sa anti-PAR antitelom. Kontrolni uzorci – TET1 (-PARP-1) i PARP-1 (-NAD⁺) (negativne kontrole).

Kako katalitička aktivnost TET proteina, u prvom koraku, podrazumeva oksidaciju 5mC do 5hmC, procena TET1 aktivnosti bazirana je na detekciji količine sintetisanog 5hmC na metilovanom DNK supstratu (Slika 4.7). Kinetika TET aktivnosti evaluirana je na osnovu porasta nivoa 5hmC detektovanog u 8 vremenskih tačaka u rasponu od 10 min. Na taj način pokazano je da PARilacija rastućim koncentracijama PARP-1 dovodi progresivno do opadanja TET1 aktivnosti smanjivanjem početne brzine

reakcije u odnosu na kontrolne uzorke (TET1 i TET1 koji je prošao proceduru PARilacije izuzev što je umesto PARP-1 dodat pufer za dijalizu) (Slika 4.7).



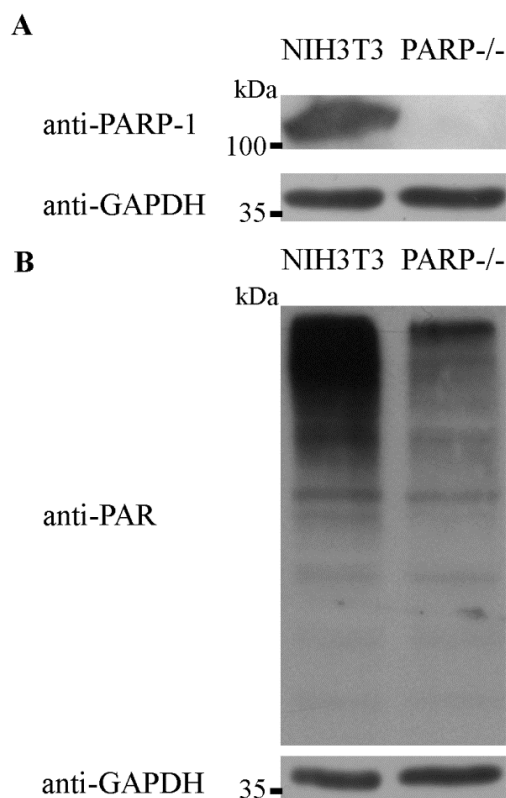
Slika 4.7. Uticaj PARilacije na kinetiku aktivnosti TET1 proteina *in vitro*. **(A)** Kinetika aktivnosti TET1 PARilovanog različitim koncentracijama PARP-1. Kinetika aktivnosti TET1 aproksimirana je eksponencijalnom funkcijom pomoću metode najmanjih kvadrata. **(B)** Početna brzina reakcija oksidacije 5mC od strane kontrolnog i PARilovanog TET1. Početne brzine reakcija izračunate su pomoću linearne regresije na osnovu izmerenog signala u početnim vremenskim tačkama kinetike TET aktivnosti, prikazanim na grafiku pod A. Vrednosti su normalizovane spram kontrolne reakcije. Prikazane su srednje vrednosti iz dva eksperimenta. a.j. - arbitrarne jedinice.

4.2. Uloga PARP-1 i PARilacije u procesima (de)metilacije DNK na globalnom nivou

Prethodni rezultati jasno ukazuju na postojanje funkcionalne interakcije TET1 i PARP-1 proteina. Obzirom da je TET1 jedan od glavnih učesnika u procesu aktivne demetilacije DNK, sledeći cilj bio je da se ispita uticaj PARP-1 i PARilacije na procese (de)metilacije DNK na globalnom nivou.

4.2.1. PARP-1 i PARilacija

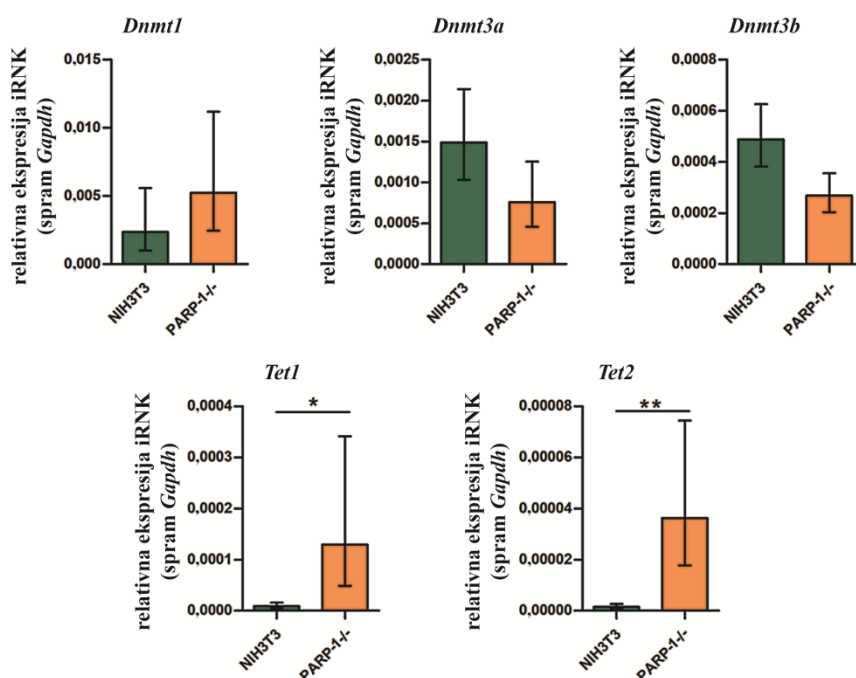
Prisustvo PARP-1 u NIH3T3 ćelijama i odsustvo u PARP^{-/-} ćelijama potvrđeno je imunoblot analizom pomoću anti-PARP-1 antitela (Slika 4.8A). Istom metodom pokazano je da odsustvo PARP-1 dovodi do vidnog smanjenja signala detektovanog anti-PAR antitelom (Slika 4.8B). Dakle, u PARP^{-/-} ćelijama dolazi do smanjenja ali ne i do potpunog izostanka PARilacije što se može pripisati aktivnosti PARP-2 proteina.



Slika 4.8. Uticaj PARP-1 na PARilaciju. (A) Imunoblot detekcija PARP-1 u NIH3T3 i PARP^{-/-} ćelijama anti-PARP-1 antitelom. (B) Imunoblot detekcija PARilacije u NIH3T3 i PARP^{-/-} ćelijama anti-PAR antitelom. Nanošenje jednakih količina ukupnih proteina lizata provereno je anti-GAPDH antitelom.

4.2.2. Uticaj PARP-1 na ekspresiju gena za proteine uključene u procese (de)metilacije DNK

Prvi korak u rasvetljavanju uticaja PARP-1 na (de)metilaciju DNK bio je da se proveriti nivo ekspresije gena koji kodiraju za proteine uključene u proces metilacije (*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*) i demetilacije (*Tet1*, *Tet2*) DNK u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama (Slika 4.9). Od analiziranih gena samo su *Tet1* i *Tet2* pokazali statistički značajan porast ($p_{Tet1} = 0,016$ i $p_{Tet2} = 0,016$) ekspresije u odsustvu PARP-1, dok se ekspresija *Dnmt1*, *Dnmt3a* i *Dnmt3b* nije značajno promenila.

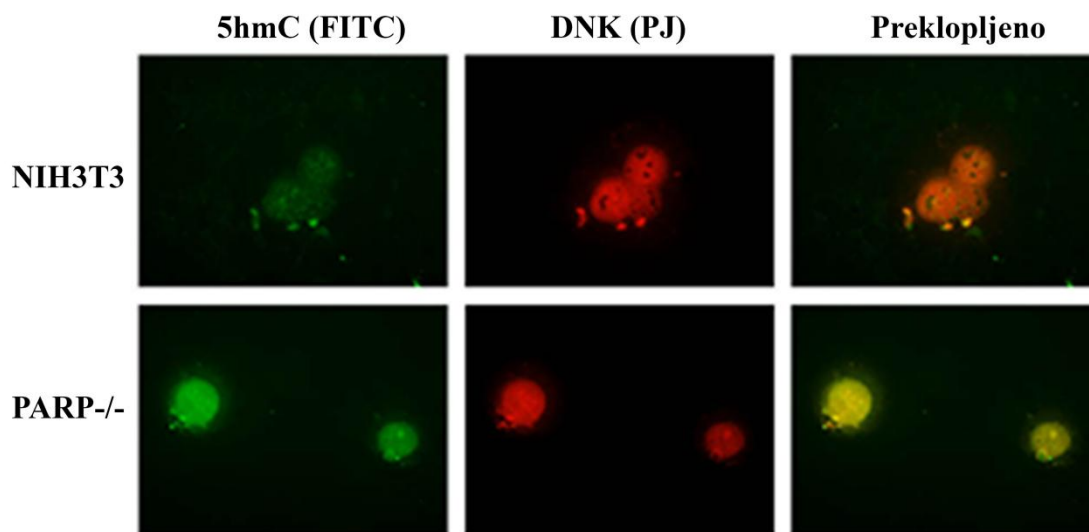


Slika 4.9. Relativni nivo ekspresije *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet1*, *Tet2* u NIH3T3 i PARP-/- ćelijskim linijama izražen spram *Gapdh* (n = 5). Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, n- broj nezavisnih eksperimenata.

4.2.3. Hidroksimetilacija DNK u odsustvu PARP-1

Nakon što je utvrđeno da su *Tet1* i *Tet2* značajno više eksprimirani na nivou iRNK u PARP-/- nego u NIH3T3 ćelijama provereno je prisustvo 5hmC na HALO preparatima jedara obe ćelijske linije, imunocitohemijskim bojenjem pomoću primarnog anti-hmC antitela i odgovarajućeg magarećeg anti-zečjeg FITC obeleženog (zeleno fluorescenca) sekundarnog antitela (Slika 4.10). Jasno je primećena razlika u intenzitetu

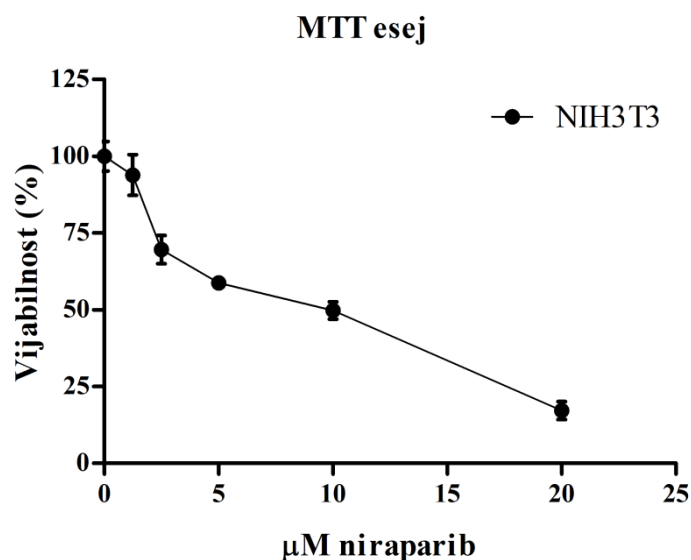
signala koji je znatno izraženiji u jedrima PARP^{-/-} ćelija u odnosu na NIH3T3 ćelije ukazujući na povećan nivo 5hmC.



Slika 4.10. Vizualizacija 5hmC imunocitohemijskim fluorescentnim bojenjem HALO preparata jedara NIH3T3 i PARP^{-/-} ćelijskih linija. Zeleno je prikazan signal 5hmC dok je DNK obojena propidijum jodidom (PJ), što je prikazano crvenom bojom.

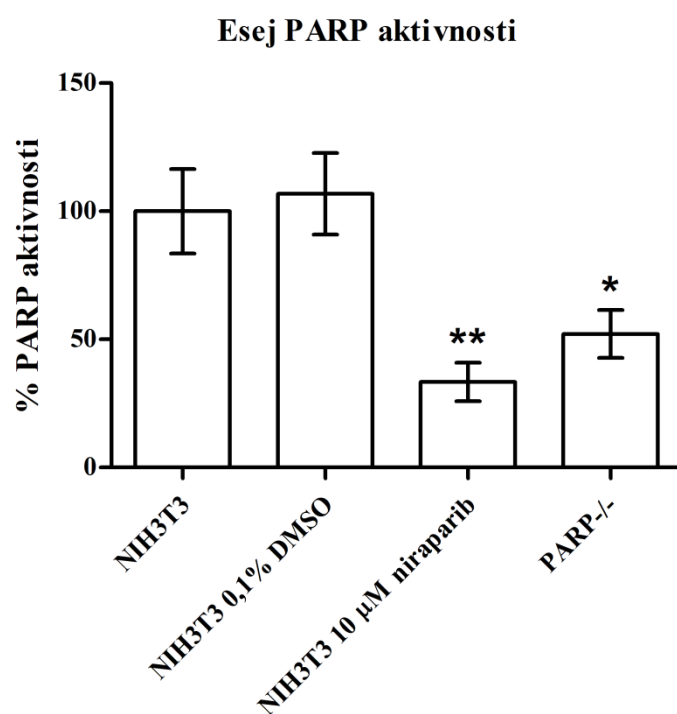
4.2.4. Inhibicija PARilacije niraparibom

Prethodni rezultati pokazali su da odsustvo PARP-1 dovodi do smanjenja nivoa PARilacije, povećane ekspresije *Tet* gena i hidroksimetilacije DNK. Ostalo je da se utvrdi da li postoji direktna veza između smanjenja PARilacije i povećanog nivoa hidroksimetilacije u procesu demetilacije DNK. Obzirom da je u prvom setu eksperimenata (poglavlje 4.1.5) pokazano da PARilacija utiče inhibitorno na aktivnost TET1 proteina (u procesu hidroksimetilacije DNK) *in vitro*, postavlja se pitanje da li PARilacija ima takav efekat i *in cellulo*. Kako bi se detaljnije ispitaio uticaj PARilacije na (de)metilaciju DNK, NIH3T3 ćelije su tretirane niraparibom koji je poznat inhibitor PARilacije. Na osnovu MTT eseja izabrana je koncentracija 10 μ M nirapariba koja predstavlja IC50 za tretman NIH3T3 ćelija (Slika 4.11).



Slika 4.11. MTT esej vijabilnosti NIH3T3 ćelija tretiranih rastućim koncentracijama nirapariba (n = 3). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti. n- broj nezavisnih eksperimenata.

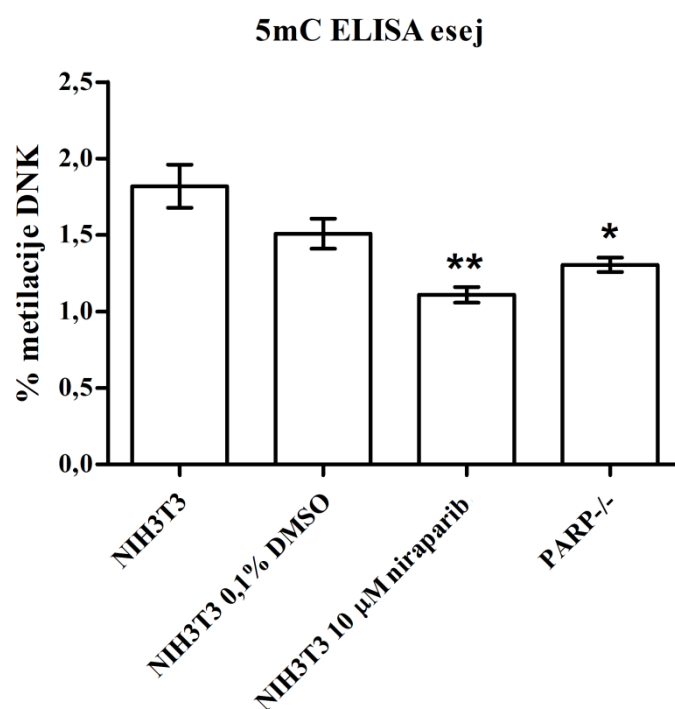
Potom je određen nivo PARP aktivnosti lizata dobijenih iz NIH3T3 ćelija tretiranih 10 μM niraparibom. Rezultat eseja PARP aktivnosti (Slika 4.12) ukazuje na to da je tretman 10 μM niraparibom doveo do statistički značajne inhibicije PARP aktivnosti kod NIH3T3 ćelija (p = 0,009), što je bio preduslov da se ova koncentracija nirapariba koristi u narednim eksperimentima. Osim toga, statistički značajan pad PARP aktivnosti izmeren je i kod PARP^{-/-} ćelija (p = 0,039). U proseku, PARP aktivnost je, u odnosu na kontrolne NIH3T3 ćelije, smanjena na 33,4% u NIH3T3 ćelijama tretiranim niraparibom, odnosno na 52,1% u PARP^{-/-} ćelijama, dok kod NIH3T3 ćelija tretiranih DMSO nije pokazana značajna promena (Slika 4.12).



Slika 4.12. PARP aktivnosti u lizatima kontrolnih NIH3T3, NIH3T3 ćelija tretiranih DMSO ili niraparibom i PARP-/- ćelija. PARP aktivnost izražena je procentualno u odnosu na kontrolne NIH3T3 ćelije (n = 3). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti. Statistička značajnost određena je poređenjem svake eksperimentalne grupe sa kontrolnom grupom NIH3T3 ćelija. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, n- broj nezavisnih ekspreimenata.

4.2.5. Uticaj inhibicije PARilacije na (de)metilaciju DNK na globalnom nivou

Globalni nivo metilacije DNK izmeren je u kontrolnim NIH3T3, NIH3T3 ćelijama tretiranim DMSO i niraparibom kao i u PARP-/- ćelijama, esejem baziranim na ELISA metodi (Slika 4.13). Pokazano je statistički značajno smanjenje nivoa globalne metilacije kod NIH3T3 ćelija tretiranih 10 μM niraparibom ($p = 0,008$) kao i kod PARP-/- ćelija ($p = 0,034$) u odnosu na kontrolne NIH3T3 ćelije, dok tretman DMSO nije doveo do značajne promene. Prosečni nivo metilacije u kontrolnim NIH3T3 ćelijama iznosio je 1,82% dok je u NIH3T3 ćelijama tretiranim niraparibom prosečan nivo metilacije smanjen na 1,12% a kod PARP-/- ćelija na 1,30%. Na ovaj način ustanovljeno je da odsustvo PARP-1 kao i inhibicija PARilacije dovode do smanjenja globalnog nivoa metilacije DNK.



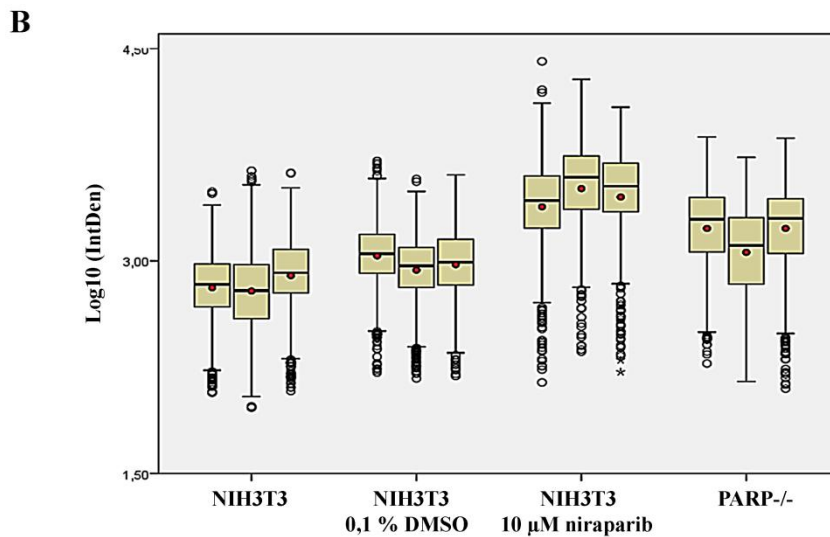
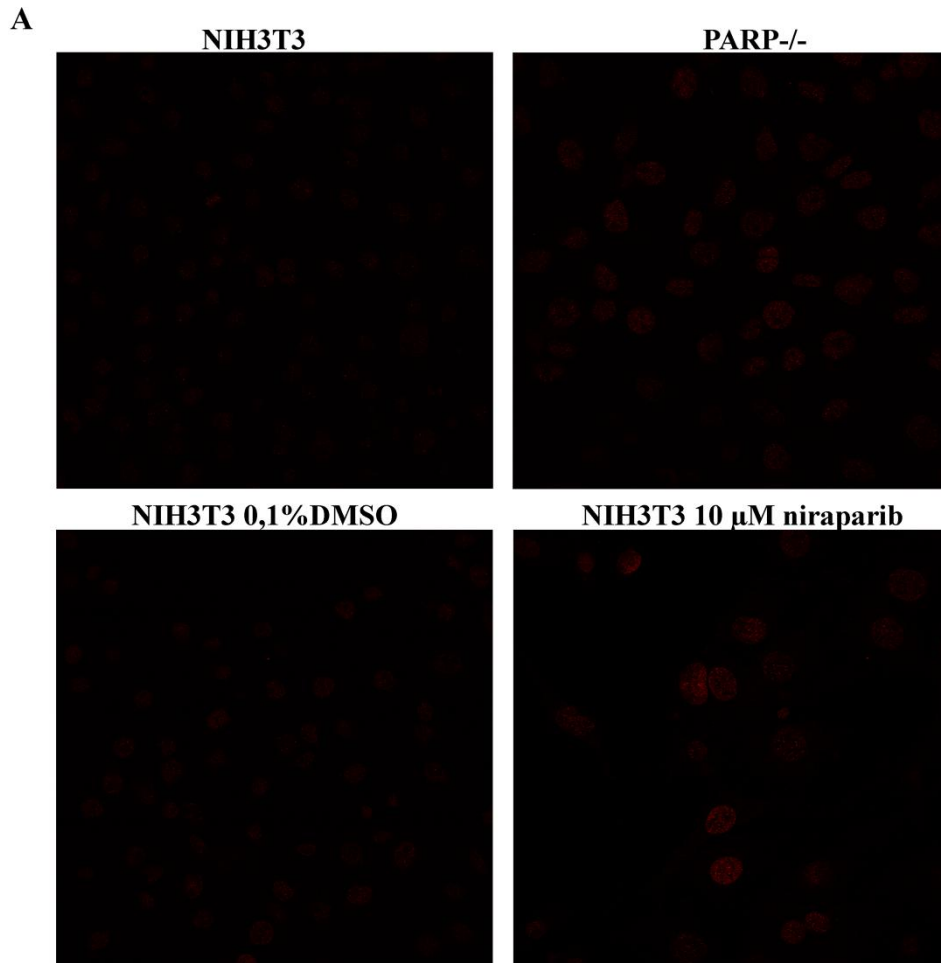
Slika 4.13. Globalni nivo metilacije DNK u kontrolnim NIH3T3, NIH3T3 ćelijama tretiranim DMSO ili niraparibom i PARP-/- ćelijama (n = 3). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti. Statistička značajnost određena je poređenjem eksperimentalnih grupa sa kontrolnom grupom NIH3T3 ćelija. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, n- broj nezavisnih ekspreimenata.

4.2.6. Uticaj inhibicije PARilacije na hidrosimetilaciju DNK

Kako bi se ustanovilo da li je dobijeno smanjenje nivoa 5mC u uslovima inhibicije PARilacije posledica povećane aktivnosti TET proteina u procesu hidrosimetilacije DNK (koja vodi do gubitka metilacije tj. do demetilacije) u sledećem eksperimentu ispitivan je nivo hmC u uslovima inhibicije PARilacije.

Hidrosimetilacija DNK detektovana je konfokalnim mikroskopom na preparatima kontrolnih NIH3T3, DMSO tretiranih i niraparibom tretiranih NIH3T3 ćelija kao i PARP-/-ćelija. Ćelije su bile imunocitohemijski obojene pomoću primarnog zečjeg anti-5hmC antitela i odgovarajućeg magarećeg anti-zečijeg Alexa Fluor 555 obeleženog (crvena fluorescenca) sekundarnog antitela (Slika 4.14A). Radi preciznijeg poređenja urađena je kvantifikacija signala (izraženog kao integrisana gustina) detektovanog u jedrima. Pripremljena su po tri preparata za svaku grupu ćelija i ukupno je kvantifikovano 2574 jedara kontrolnih NIH3T3 ćelija, 2899 jedara NIH3T3 ćelija

tretiranih 0,1 % DMSO, 1032 jedara NIH3T3 ćelija tretiranih 10 μ M niraparibom i 2009 jedara PARP-/- ćelija. Pokazano je da se sve grupe međusobno statistički značajno razlikuju sa $p \leq 0,001$. Najveća količina 5hmC detektovana je u NIH3T3 ćelijama tretiranim 10 μ M niraparibom, zatim PARP-/- i DMSO tretiranim NIH3T3 ćelijama, dok je najslabiji signal detektovan u kontrolnim NIH3T3 ćelijama. Postoje podaci da tretman DMSO može uticati na nivo hmC (Thaler i sar., 2012) što je bio slučaj u ovom eksperimentu. Iako je DMSO doveo do malog ali značajnog povećanja količine 5hmC, tretman niraparibom rastvorenim u DMSO je doveo do znatno većeg porasta 5hmC signala što je nedvosmisleno pokazalo da inhibicija PARilacije značajno pozitivno utiče na nivo hidrosimetilacije DNK. Ovi rezultati ukazuju na inhibitorni uticaj PARilacije na aktivnost TET enzima *in cellulo*.



Slika 4.14. Nivo 5hmC u kontrolnim NIH3T3, NIH3T3 ćelijama tretiranim DMSO ili niraparibom i PARP-/- ćelijama. **(A)** Ćelije imunocitohemijski obojene anti-5hmC antitelom slikane na konfokalnom mikroskopu. **(B)** Kvantifikacija 5hmC signala pojedinačnih ćelija sa slika napravljenih konfokalnim mikroskopom. Za svaku grupu pripremljeno je po tri preparata. Na slici je prikazan box-plot dijagram na kom je crvenim kružićem obeležena srednja vrednost signala pojedinačnih ćelija svakog preparata izražena kao $\log_{10}(\text{IntDen})$. Sve grupe analiziranih

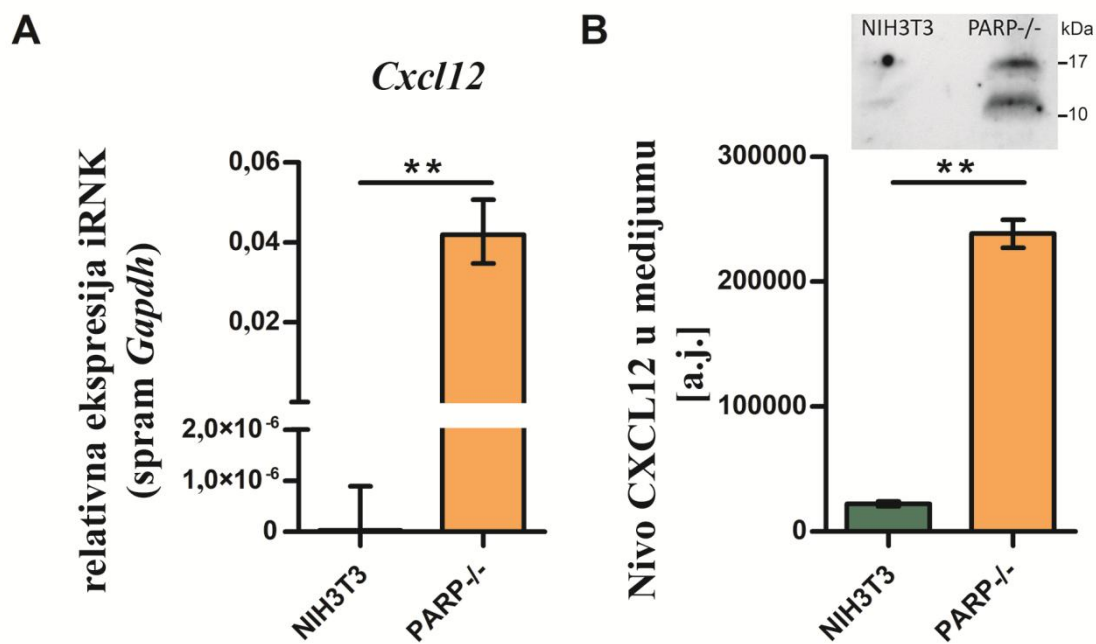
ćelija se međusobno statistički značajno razlikuju sa $p^{***} \leq 0,001$. IntDen - integrisana gustina signala.

4.3. Funkcionalna analiza lokalnih efekata interakcije TET-PARP proteina na primeru *Cxcl12* gena

Rezultati prehodna dva poglavlja jasno ukazuju na postojanje funkcionalne veze PARilacije i demetilacije DNK na globalnom nivou. Ustanovljeno je da smanjena PARP aktivnost, bilo usled odsustva PARP-1 ili inhibicije PARilacije, dovodi do pojačane TET-posredovane hidrosimetilacije DNK koja se ogleda u smanjenju globalnog nivoa 5mC i povećanju nivoa 5hmC u DNK što rezultuje u demetilaciji DNK. Sveukupno se može zaključiti da PARP-1-zavisna PARilacija ima inhibitoran efekat na TET-posredovanu oksidaciju 5mC do 5hmC u procesu demetilacije DNK. Ipak, globalni efekti ne moraju uvek odgovarati efektima na lokalnom nivou tako da je sledeći cilj bio da se ispita uticaj koji TET-PARP interakcija može imati na epigenetičku regulaciju pojedinačnih gena. U tu svrhu, odabran je *Cxcl12* gen na kome je ispitana regulacija lokalne (de)metilacije i ekspresije u odsustvu PARP-1.

4.3.1. Ekspresija *Cxcl12* u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama

U prvom koraku ispitan je nivo ekspresije *Cxcl12* u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama. Rezultati RT-qPCR ukazuju na to da je u odsustvu PARP-1 u PARP-/- ćelijama znatno viša ekspresija *Cxcl12* gena (1.3×10^6 puta), nego u NIH3T3 ćelijama (Slika 4.15A). Ustanovljeno je i da je ova razlika statistički značajna ($p = 0,009$). Sličan trend primećen je i za nivo CXCL12 proteina izlučenog u medijum iz NIH3T3 i PARP-/- ćelija. Naime, detektovana količina CXCL12 u medijumu je bila statistički značajno veća ($p = 0,0057$) kod PARP-/- nego NIH3T3 ćelija (Slika 4.15B).

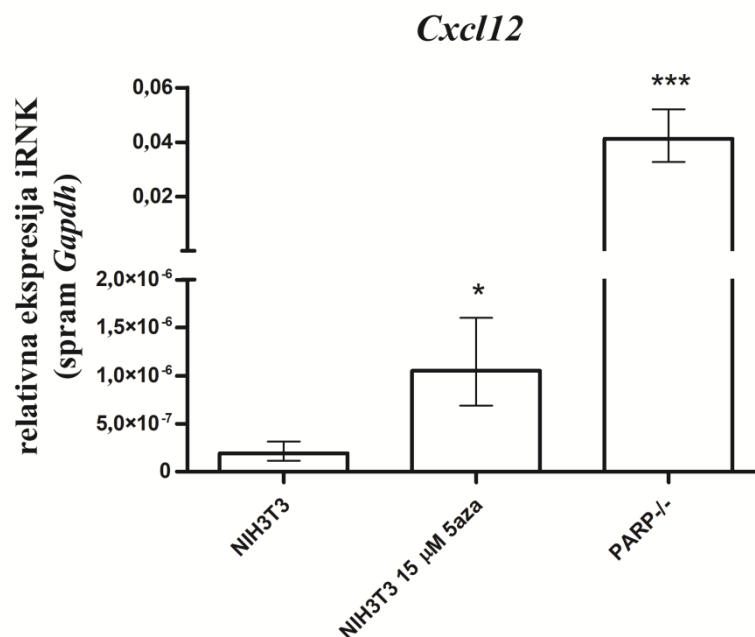


Slika 4.15. Ekspresija *Cxcl12* gena i nivo izlučenog CXCL12 proteina. **(A)** Relativni nivo ekspresije *Cxcl12* u NIH3T3 i PARP-/- ćelijskim linijama izražen spram *Gapdh* (n = 6). **(B)** Imunoblot analiza CXCL12 izlučenog u medijumu iz NIH3T3 i PARP-/- ćelija (n = 3). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti. **p ≤ 0.01, n- broj nezavisnih ekspreimenata

4.3.2. Uticaj demetilacije na ekspresiju *Cxcl12* gena

Kako bi se ispitalo da li je *Cxcl12* gen podložan epigenetičkoj regulaciji ekspresije putem (de)metilacije, NIH3T3 ćelije su tretirane poznatim opštim demetilujućim agensom 5aza, nakon čega je analizirana ekspresija *Cxcl12* gena.

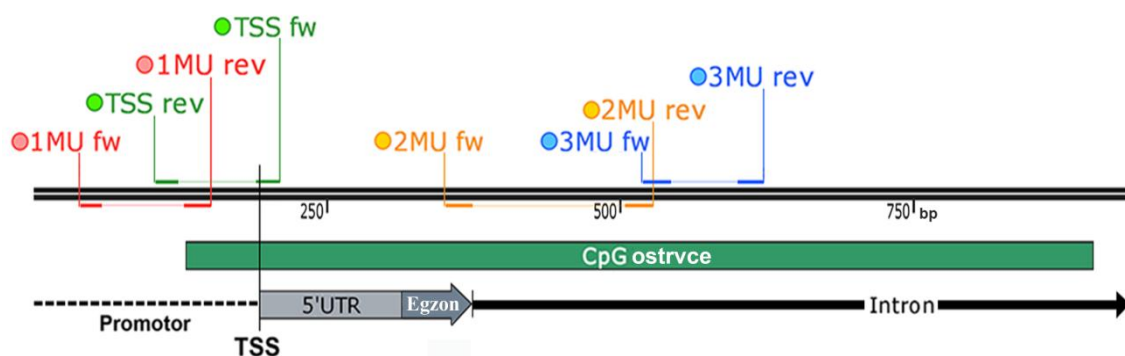
U NIH3T3 ćelijama tretiranim 15 μM 5aza detektovan je porast ekspresije *Cxcl12* u proseku 5.5 puta u odnosu na kontrolne NIH3T3 ćelije (tretirane DMSO). U PARP-/- ćelijama detektovan je još veći porast ekspresije *Cxcl12* od čak 2×10^5 puta u odnosu na kontrolne NIH3T3 ćelije (Slika 4.16). Oba povećanja bila su statistički značajna ($p_{5aza} = 0,02$ i $p_{PARP-/-} = 1,9 \times 10^{-8}$). Dakle, ovim ekspreimentom potvrđeno je da (de)metilacija DNK ima ulogu u regulaciji ekspresije *Cxcl12* gena.



Slika 4.16. Relativni nivo ekspresije *Cxcl12* u kontrolnim NIH3T3 ćelijama (tretiranim DMSO), NIH3T3 ćelijama tretiranim 15 μM 5aza i PARP-/- ćelijama izmeren RT-qPCR metodom (n = 5). Statistička značajnost određena je poređenjem eksperimentalnih grupa sa kontrolnom grupom NIH3T3 ćelija (tretiranih DMSO). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, n- broj nezavisnih eksperimenata

4.3.3. Metilacioni profil *Cxcl12* gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama

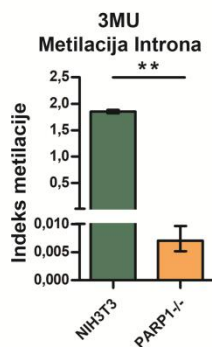
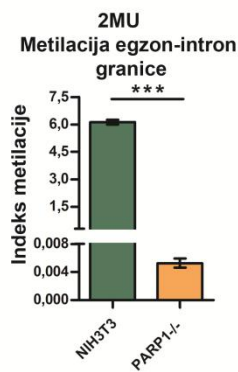
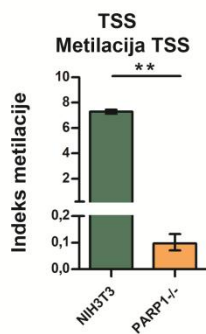
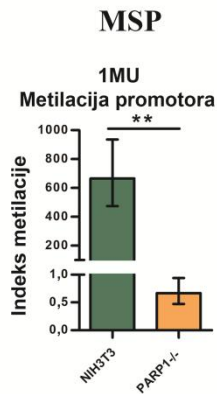
Obzirom da je pokazano da *Cxcl12* gen podleže epigenetičkoj transkripcionoj regulaciji putem (de)metilacije sledeći zadatak bio je usmeren na analizu metilacionog profila *Cxcl12* gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama. Najpre je bioinformatičkom analizom potvrđeno prisustvo CpG ostrvca koje obuhvata deo promotora, 5' UTR, prvi egzon i deo prvog introna u mišjem genu za *Cxcl12* (Slika 4.17). Potom su dizajnirani prajmeri za analizu metilacije u okviru promotora, TSS, egzon-intron granice i u delu prvog introna (slika 4.17). Analiza metilacije urađena je MSP i HRM metodama (baziranim na PCR tehnici) za NIH3T3 i PARP-/- ćelije u okviru četiri regiona (Slika 4.18).



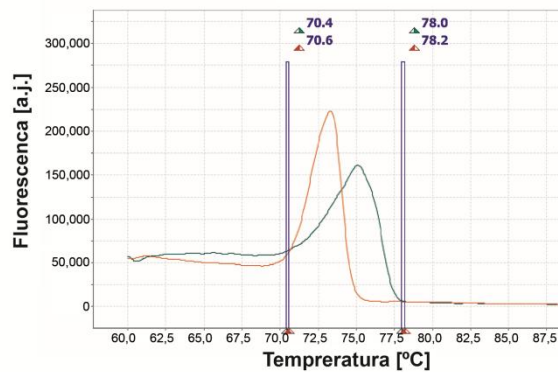
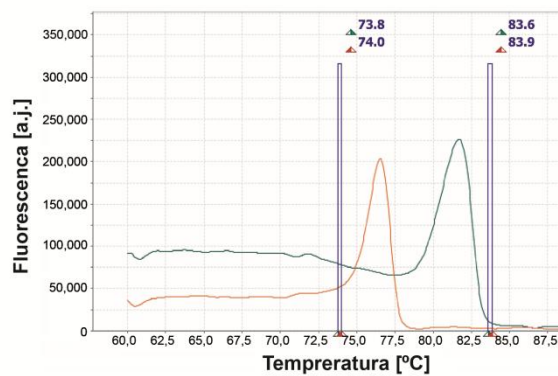
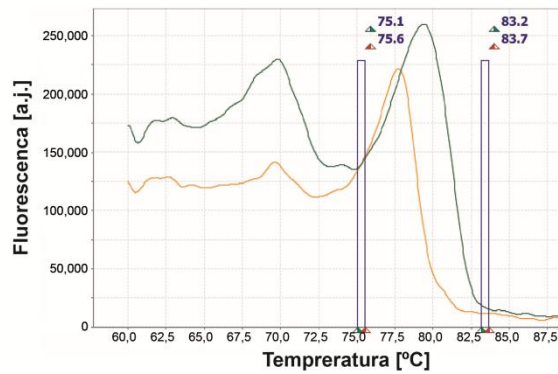
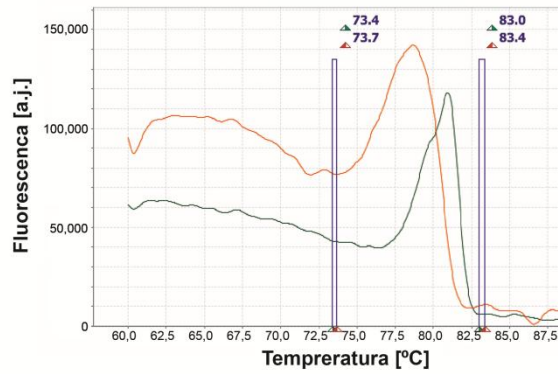
Slika 4.17. Šematski prikaz dela mišjeg *Cxcl12* gena sa označenim pozicijama CpG ostrvca i prajmera koji su korišćeni za MSP i HRM.

Najveća razlika u prosečnim vrednostima metilacionog indeksa ustanovljena je za egzon-intron granicu i promotorski region. Za oba pomenuta regiona prosečan metilacioni indeks je redom bio 1172.2 i 995.3 puta veći u NIH3T3 nego PARP-/- ćelijama. U NIH3T3 ćelijama prosečan metilacioni indeks za intronski region bio je 262,5 puta, a za TSS region 75,3 puta veći nego u PARP-/- ćelijama. Sve izmerene razlike su bile statistički značajne sa $p = 0.006606$ za promotor, $p = 0.005774$ za TSS, $p = 0.00036$ za egzon-intron granicu i $p = 0.002916$ za intronski region. Treba obratiti pažnju na to da je metilacioni indeks relativna mera metilacije koja u slučaju vrednosti preko 1 pokazuje da je analizirana sekvenca pretežno metilovana, dok za vrednosti niže od 1 važi suprotno, da je sekvenca pretežno nemetilovana. Kako su za sve analizirane regione prosečne vrednosti metilacionog indeksa kod NIH3T3 ćelija bile konzistentno preko 1 a kod PARP-/- ispod 1 sveukupno je pokazano da je u kontrolnim NIH3T3 ćelijama prevladala metilacija analiziranih regiona *Cxcl12* gena, dok je u odsustvu PARP-1 došlo do značajnog gubitka metilacije tako da je u analiziranim regionima u PARP-/- ćelijama *Cxcl12* gen u najvećoj meri nemetilovan. Ipak, MSP analiza se odnosi samo na metilaciju CpG dinukleotida koji su u okviru sekvenci komplementarnih prajmerima (1-3 CpG po prajmeru, ukupno 17 CpG u sva četiri seta prajmera). Zbog toga je dodatno urađena i HRM analiza istih regiona kako bi se prikupile dodatne informacije o metilaciji duž celih amplicona (Slika 4.18). Očekivano, rezultati HRM analize bili su u skladu sa MSP rezultatima, jer su izmerene temperature topljenja bile konzistentno niže za PARP-/- nego NIH3T3 uzorke za sva četiri amplicona, što ukazuje da je u NIH3T3 ćelijama bilo više metilacije celom dužinom analiziranih ciljnih

sekvenci. Naime, najveća razlika u temperaturama topljenja izmerena je za region egzon-intron granice (5,2°C), a zatim za regione promotora i introna (2,2°C i 2°C), sa najmanjom razlikom uočenom u TSS regionu (1.7°C).



HRM



— NIH3T3
— PARP1-/-

Ciljna sekvenca

5' -TCAGCACCCAG**CGG**
AGCC**CGCG**GACTGAGG
G**CG**CCAAGAAGGGGGT
GGTAGGTAGGGAAGTGG
AAGGG**CG**GCTGCT**CGC**
AGGGGATG**CGCG**TCAGA
GACCCAGCCACA-3'

5' -GAAGGG**CG**GCTGCT
C**CG**CAGGGGATG**CGCG**T
CAGAGACCCAGCCACA
CTCCAGGCC**CG**CCCCTT
GATGAGCC**CG**CCCC**CGC**
CC**CG**CCTGGTTTT**CG**CC
TCTAAAGC-3'

5' -TGGC**CGCG**CTCTGC
ATCAGTGAC**CGGT**GAGTG
CAATC**CGCG**GCC**CGGG**CC
CGGGAAAGGCT**CG**CAGC
TCTG**CG**CC**CG**GAGCTCCT
T**CGGG**T**CGCG**GTTCCCT
CTGCC**CGCG**CC**CGA**AGT**C**
CGGGAGAAGAAGT**CGG**
T**CGCG**CC**CGT**TCACTAC
AAG**CGA**ACTTGGGGCAG
TCCACTTTGCA-3'

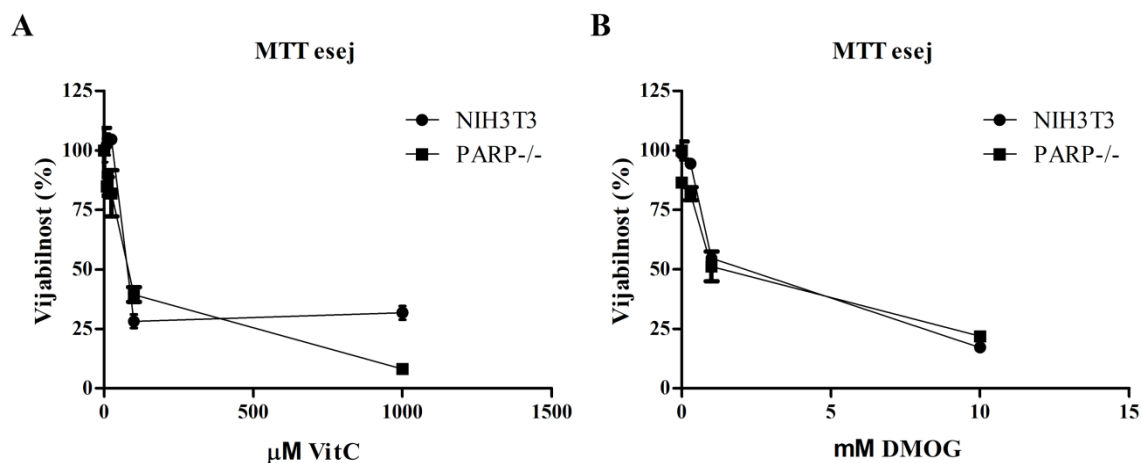
5' -CCACTTTGCAGGGC
GCACTCCAC**CGGG**TGC
CCTTCC**CGT**GTCCAC
GGGT**CG**CAC**CG**AGGTTT
TGTGCTCT**CGGA**AGT**G**
GCCATAGGACCTAGAG
AGGGC-3'

Slika 4.18. Nivo metilacije različitih delova *Cxcl12* gena u PARP^{-/-} u poređenju sa NIH3T3 ćelijskom linijom izmeren MSP i HRM metodama (n = 3). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti. **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, n- broj nezavisnih ekspreimenata.

4.3.4. Uticaj TET aktivnosti na ekspresiju *Cxcl12* gena u NIH3T3 i PARP^{-/-} ćelijama

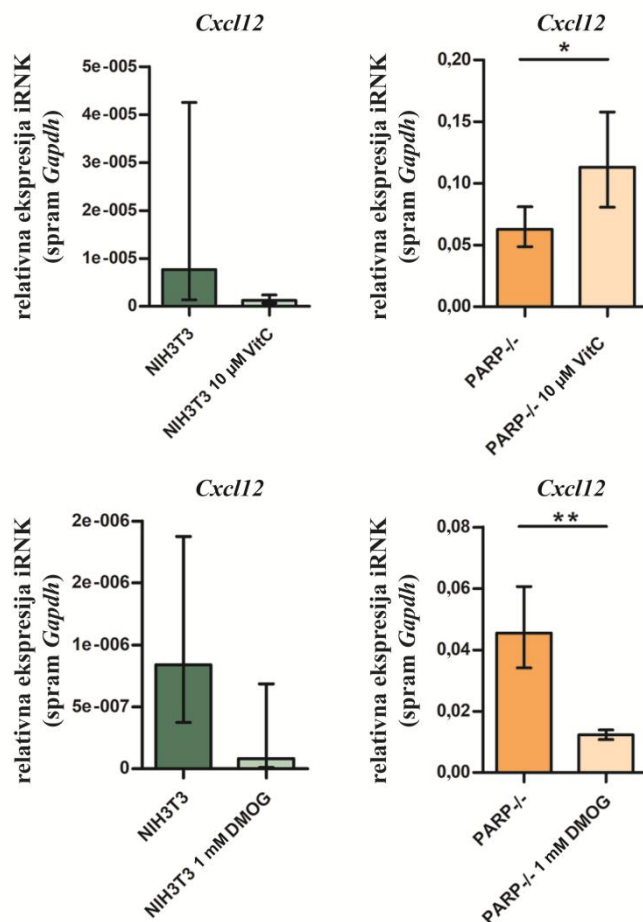
Prethodni rezultati iz poglavlja 4.1. i 4.2. ukazuju na mogućnost da TET aktivnost igra važnu ulogu u procesima aktivne demetilacije u odsustvu PARP-1. Kako bi se proverilo da li je TET aktivnost uključena i u regulaciju ekspresije *Cxcl12* gena u odsustvu PARP-1, NIH3T3 i PARP^{-/-} ćelije su tretirane aktivatorom (VitC), i inhibitorom (DMOG) TET aktivnosti i praćena je ekspresija *Cxcl12*.

Najpre je ispitan uticaj različitih koncentracija ovih supstanci na vijabilnost NIH3T3 i PARP^{-/-} ćelija i na osnovu MTT eseja (Slika 4.19) i literaturnih podataka odabrane su odgovarajuće koncentracije i uslovi za dalje tretmane. Za VitC odabran je tretman 10 μM koncentracijom u trajanju od 48 h, za koji postoje podaci da pojačava hidrosimetilaciju DNK u kulturi mišjih embrionalnih fibroblasta (Minor i sar., 2013). U istraživanju u okviru ove teze, MTT esej je pokazao da tretman 10 μM VitC u trajanju od 48 h ne dovodi do značajnog smanjenja vijabilnosti NIH3T3 ćelija, dok kod PARP^{-/-} ćelija dolazi u proseku do pada vijabilnosti od 15% (Slika 4.19A). Za DMOG je odabran tretman 1 mM koncentracijom u trajanju od 24 h, koja je prema rezultatima MTT eseja bliska IC₅₀ vrednosti za obe ćelijske linije NIH3T3 i PARP^{-/-} (Slika 4.19B), a takođe je korišćena za inhibiciju TET aktivnosti u bar dva publikovana istraživanja (Amouroux i sar., 2016; J. Zhang i sar., 2017).



Slika 4.19. MTT esej vijabilnosti NIH3T3 i PARP-/- ćelija tretiranih rastućim koncentracijama (A) VitC i (B) DMOG (n = 3). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti, n- broj nezavisnih eksperimenata.

Nakon tretmana sa VitC i DMOG izmeren je relativni nivo ekspresije *Cxcl12* (Slika 4.20) kako bi se procenio uticaj TET aktivnosti na regulaciju ekspresije ovog gena. Statistički značajne razlike između ćelija gajenih u kontrolnim uslovima i tretiranih ćelija uočene su samo za PARP-/- uzorke, ali ne i za NIH3T3. U PARP-/- ćelijama, ekspresija *Cxcl12* je značajno ($p = 0,024$) povećana u proseku 1,8 puta nakon tretmana sa VitC dok je značajno ($p = 0,005$) smanjena u proseku 3,7 puta nakon DMOG tretmana (Slika 4.20). Ovi rezultati indirektno nagoveštavaju ulogu PARP-1 u regulaciji aktivnosti TET proteina ukazujući da su, u odsustvu PARP-1, TET potentni enzimi čija aktivnost može lokalno uticati na ekspresiju pojedinačnih gena poput *Cxcl12*.

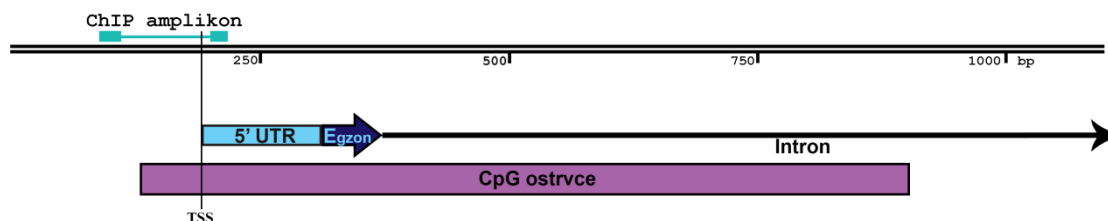


Slika 4.20. Ekspresija *Cxcl12* gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama tretiranim 10 μM VitC ili 1 mM DMOG (n = 3). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti, n- broj nezavisnih ekspreimenata.

4.3.5. Prisustvo TET proteina na promotoru *Cxcl12* gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama

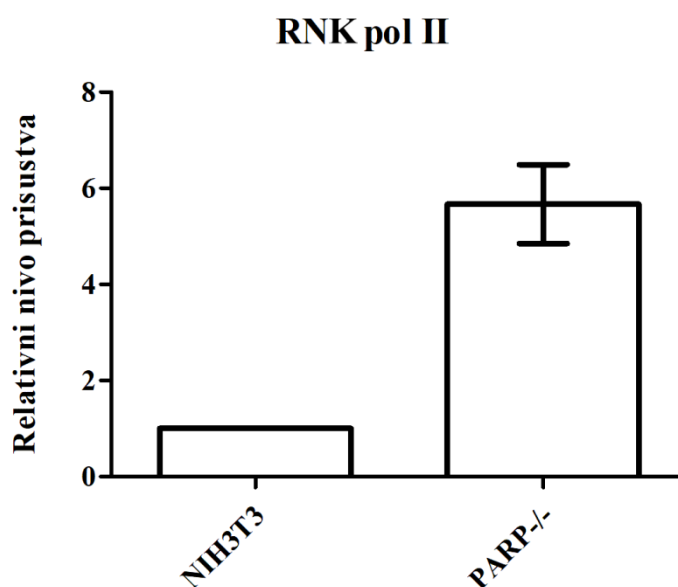
Prethodni rezultati upućuju na to da aktivnost TET proteina u odsustvu PARP-1 ima uticaja na ekspresiju *Cxcl12*. Sledeći korak bio je da se ispita prisustvo TET proteina na *Cxcl12* promotoru u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama što bi potvrdilo ulogu TET proteina u regulaciji demetilacije što finalno utiče na ekspresiju *Cxcl12* gena u odsustvu PARP-1.

ChIP metodom praćenom qPCR kvantifikacijom provereno je prisustvo RNA pol II (Slika 4.22), TET1 (Slika 4.23) i TET2 (Slika 4.24) na promotoru *Cxcl12* gena u okviru regiona koji se nalazi neposredno uz TSS (Slika 4.21), u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama.



Slika 4.21. Šematski prikaz dela mišjeg *Cxcl12* gena sa označenim pozicijama prajmera korišćenih za ChIP.

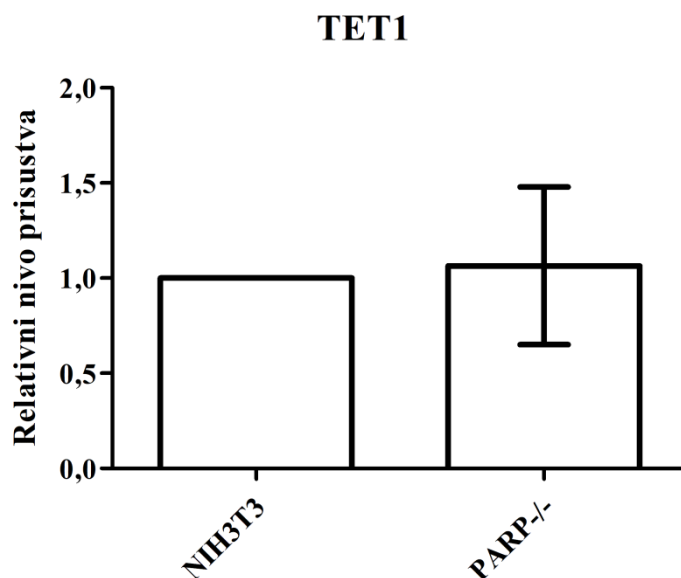
Kontrolni ChIP eksperimenti urađeni su sa anti-RNK pol II antitelom i na osnovu dobijenog rezultata ustanovljeno je da je RNK pol II bila prisutnija (u proseku 5,7 puta više) na *Cxcl12* promotoru kod PARP^{-/-} nego kod NIH3T3 ćelija (Slika 4.22). Ovaj rezultat u skladu je sa prethodno ustanovljenim profilom ekspresije *Cxcl12* gena u ovim ćelijskim linijama, odnosno sa povećanom ekspresijom u PARP^{-/-} ćelijama.



Slika 4.22. Analiza prisustva RNK pol II na promotoru *Cxcl12* gena ChIP-qPCR metodom. Nivo prisustva izračunat je normalizacijom u odnosu na IgG imunoprecipitaciju a zatim prikazan relativno u odnosu na NIH3T3 uzorak (n = 2). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti, n- broj nezavisnih eksperimenata.

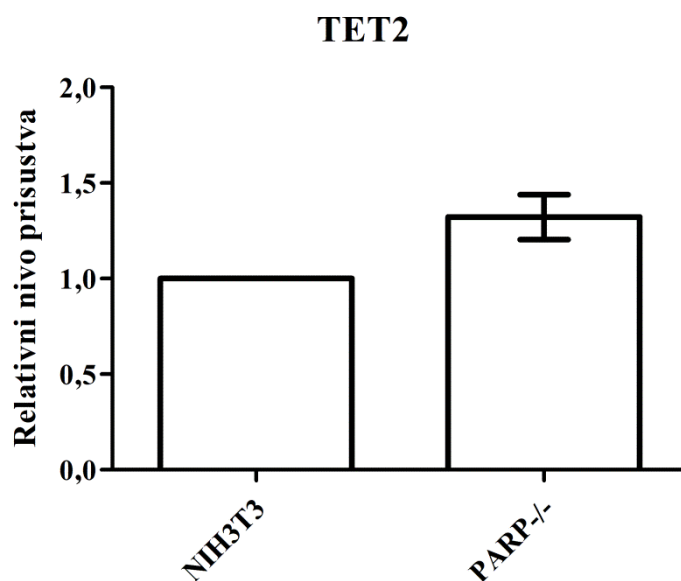
Osim toga, ChIP eksperimentom je utvrđeno i da TET proteini stupaju u interakciju sa promotorskim regionom *Cxcl12* u obe ćelijske linije, NIH3T3 i PARP^{-/-}. Ipak, rezultati dobijeni za TET1 nisu bili dovoljno konzistentni da bi se moglo proceniti

da li zaista dolazi do promene u njegovoj zastupljenosti na promotoru *Cxcl12* gena u PARP^{-/-} ćelijama u odnosu na NIH3T3 ćelije (Slika 4.23).



Slika 4.23. Analiza prisustva TET1 na promotoru *Cxcl12* gena ChIP-qPCR metodom. Nivo prisustva izračunat je normalizacijom u odnosu na IgG imunoprecipitaciju a zatim prikazan relativno u odnosu na NIH3T3 uzorak (n = 2). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti, n- broj nezavisnih ekspreimenata.

Sa druge strane, rezultati ChIP eksperimenta jasno pokazuju stabilan porast prisustva TET2 na promotorskom regionu *Cxcl12* kod PARP^{-/-} u odnosu na NIH3T3 ćelije (Slika 4.24). U proseku, TET2 je 1,32 puta više prisutan na promotoru *Cxcl12* u odsustvu PARP-1. Imajući u vidu sve prethodne rezultate ishod ovog eksperimenta ne isključuje mogućnost da oba TET proteina učestvuju u regulaciji ekspresije *Cxcl12* gena, posebno zato što su oba proteina detektovana na njegovom promotoru. Međutim, rezultati koji se odnose na TET2 usmerili su krajnje eksperimente ka proveru moguće interakcije i ovog proteina TET familije sa PARP-1 i njegove PARilacije od strane PARP-1.

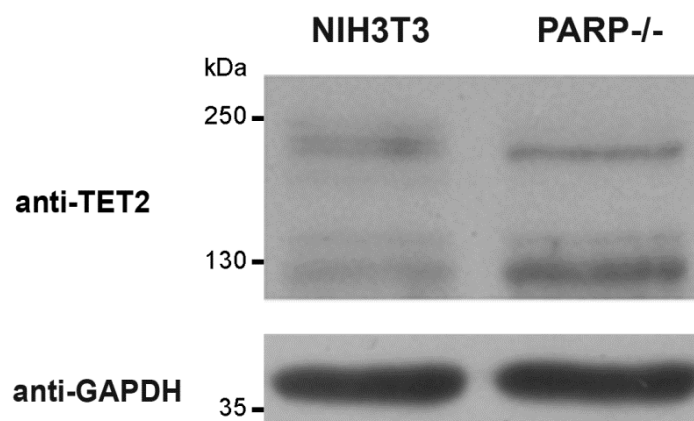


Slika 4.24. Analiza prisustva TET2 na promotoru *Cxcl12* gena ChIP-qPCR metodom. Nivo prisustva je izračunat normalizacijom u odnosu na IgG imunoprecipitaciju a zatim prikazan relativno u odnosu na NIH3T3 uzorak (n = 2). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti, n-broj nezavisnih ekspreimenata.

4.3.6. Međusobna povezanost TET2 i PARP-1 proteina: međuproteinske interakcije i PARilacija TET2 od strane PARP-1 proteina

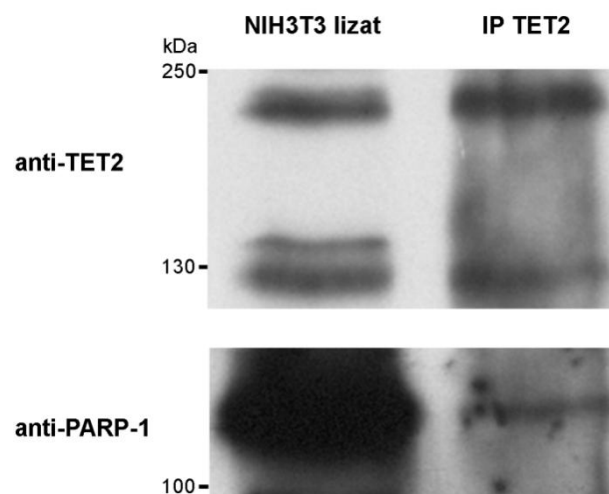
Obzirom da je do sada pokazano da je u odsustvu PARP-1 povećana demetilacija *Cxcl12* gena kao i mobilizacija TET2 na *Cxcl12* promotoru, ostalo je da se proveriti da li se TET2 i PARP-1 nalaze u međuproteinskim interakcijama putem kojih bi PARP-1 mogao inhibitorno da utiče na procese demetilacije na lokalnom nivou.

U prvom koraku provereno je prisustvo TET2 proteina u lizatima NIH3T3 i PARP^{-/-} ćelija. Imunoblot metodom pomoću anti-TET2 antitela pokazano je povećano prisustvo ovog proteina u odsustvu PARP-1 (Slika 4.25).



Slika 4.25. Imunoblot detekcija TET2 u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama anti-TET2 antitelom. Nanošenje jednakih količina ukupnih proteina lizata provereno je anti-GAPDH antitelom.

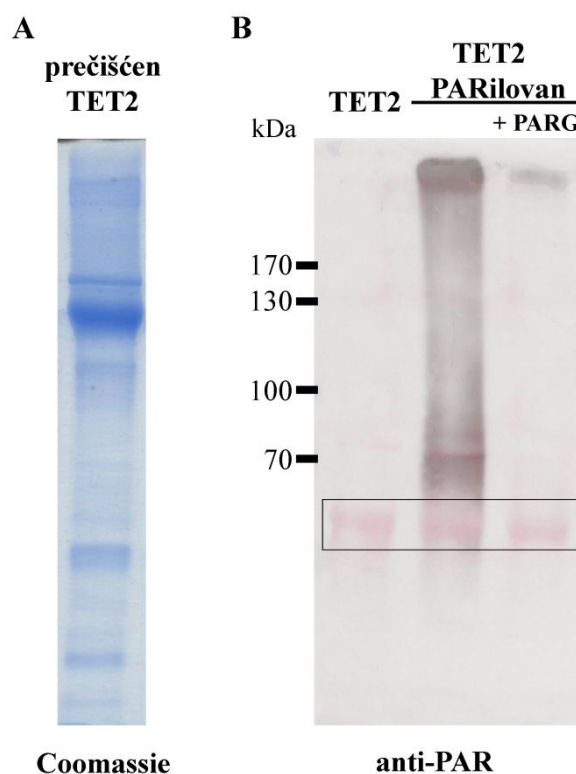
Kako bi se utvrdilo da li dolazi do interakcije TET2 i PARP-1 *in cellulo* urađena je imunoprecipitacija iz lizata NIH3T3 ćelija anti-TET2 antitelom. Zatim je imunoblot metodom pomoću anti-TET2 antitela potvrđena uspešna imunoprecipitacija ovog proteina a ustanovljeno je i prisustvo koprecipitovanog PARP-1 odgovarajućim anti-PARP-1 antitelom (Slika 4.26). Ovaj rezultat ukazuje na direktnu ili indirektnu interakciju TET2 i PARP-1 *in cellulo*.



Slika 4.26. Ko-immunoprecipitacija TET2 i PARP-1 proteina iz lizata NIH3T3 ćelija. Imunoblot analiza prisustva TET2 i PARP-1 proteina u imunoprecipitatu korišćenjem anti-TET2 i anti-PARP-1 antitela. IP-immunoprecipitat.

Nakon što je ustanovljeno da TET2 i PARP-1 interaguju provereno je i da li TET2 podleže *in vitro* PARilaciji od strane PARP-1. Za ovaj ekspreiment je prvo, iz

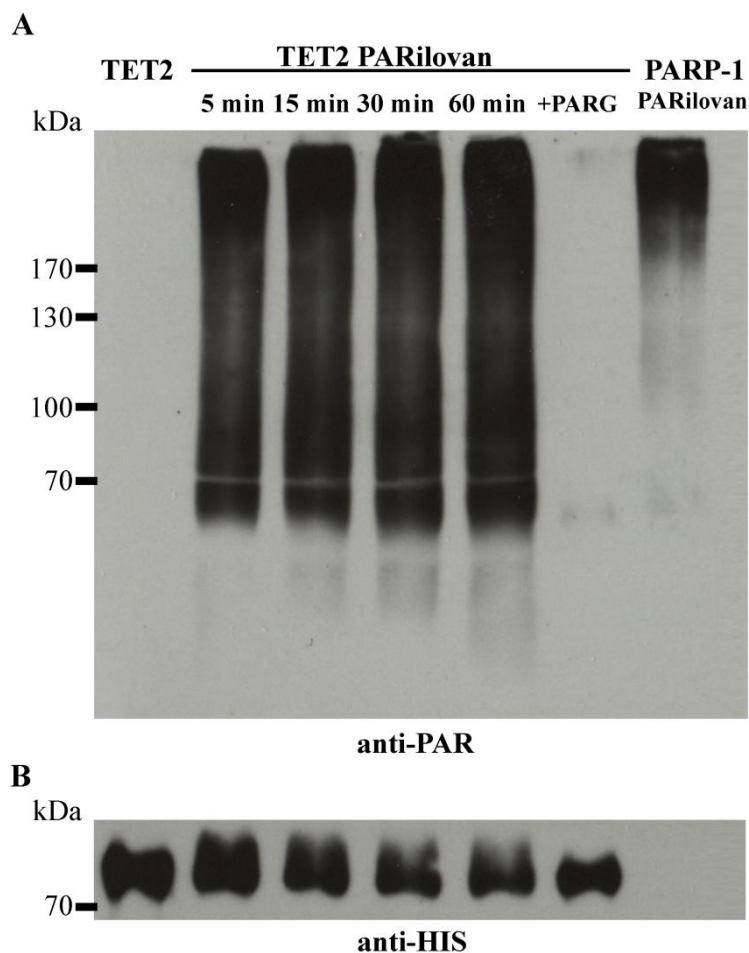
kulture bakterija, prečišćen rekombinantni, histidinom obeležen, katalitički domen mišjeg TET2 (Slika 4.27A). Prečišćeni TET2 je zatim podvrgnut reakciji *in vitro* PARilacije uz pomoć komercijalnog rekombinantnog humanog PARP-1 proteina. Uspešnost PARilacije proverena je imunoblot analizom sa anti-PAR antitelom. Kao i kod *in vitro* PARilacije TET1 proteina (poglavlje 4.1.3.) i u ovom slučaju detektovan je PAR signal koji se razvlači od pozicije rekombinantnog (katalitičkog domena) TET2 proteina ustanovljene Ponceau bojenjem, do vrha membrane (Slika 4.27B). Specifičnost PAR signala dodatno je potvrđena tretiranjem prethodno PARilovanog TET2 proteina PARG enzimom koji uklanja PAR polimere, što je dovelo do primetnog gubitka signala usled degradacije PAR polimera.



Slika 4.27. *In vitro* PARilacija TET2 od strane PARP-1 proteina. (A) Prečišćen rekombinantni katalitički domen mišjeg TET2 proteina. (B) Preklapljeni slikom membrane bojene Ponceau-S bojom sa slikom filma nakon imunoblot detekcije PAR polimera. Vizualizovani su: nemodifikovani katalitički domen TET2, *in vitro* PARilovani katalitički domen TET2 i *in vitro* PARilovani katalitički domen TET2 tretiran PARG enzimom. Pravougaonim okvirom označena je pozicija nemodifikovanog katalitičkog domena TET2.

Poređenjem sa kontrolnom reakcijom u kojoj je samo PARP-1 PARilovan, na slici 4.28A uočeno je da se već nakon 5 min reakcije dostigao znatan nivo *in vitro* PARilacije TET2, koji se sa produžavanjem reakcije na 15 min, 30 min i 60 min

neznatno povećava. Kod detekcije anti-HIS antitelom (Slika 4.28B) takođe je primećeno blago razvlačenje signala ka višim molekulskim težinama dok se nakon tretmana PARG, signal javlja samo na originalnoj poziciji u nivou nemodifikovanog TET2 (katalitičkog domena) što potvrđuje da je TET2 uspešno PARilovan i da je razvlačenje signala zaista posledica PARilacije.



Slika 4.28. Kinetika *in vitro* PARilacije TET2 od strane PARP-1 proteina. *In vitro* PARilacija TET2 vizualizovana je imunoblot metodom pomoću (A) anti-PAR i (B) anti-HIS antitela. Kontrolni uzorci - nemodifikovan TET2 i *in vitro* PARilovan TET2 tretiran PARG enzimom (negativne kontrole) i *in vitro* auto-PARilovan PARP-1 (pozitivna kontrola).

Rezultati ovog dela istraživanja pokazali su postojanje TET2-PARP-1 interakcije, podložnost TET2 proteina PARilaciji kao i povećano prisustvo TET2 na promotoru *Cxcl12* gena u odsustvu PARP-1 što upućuje na potencijalnu ulogu TET2-PARP-1 interakcije u procesima demetilacije na lokalnom nivou u ovom slučaju *Cxcl12* gena.

Sveukupno, inhibitorni uticaj PARP-1 na procese TET-posredovane demetilacije na globalnom nivou potvrđen je i lokalno, na primeru *Cxcl12* gena.

5. DISKUSIJA

Metilacija DNK je jedan od najranije otkrivenih i najviše istraživanih epigenetičkih mehanizama regulacije ekspresije gena. Međutim, detalji procesa demetilacije DNK dugo su predstavljali nepoznanicu i tek sa otkrićem TET familije proteina rasvetljeni su neki aspekti ovog procesa. TET proteini imaju sposobnost aktivnog pokretanja demetilacije DNK katalizom oksidacije 5mC do 5hmC što predstavlja prvi korak u ovom procesu. Osim toga, sve je više istraživanja koja ukazuju na to da 5hmC nije značajan samo kao međustadijum u demetilaciji DNK već može imati i ulogu kao zasebno epigenetičko obeležje. Jasno je da TET proteini igraju važnu ulogu u epigenetičkoj regulaciji i samim tim u brojnim fiziološkim ali i patološkim stanjima koja su bar delimično epigenetički regulisana. Upravo je zato važno usmeriti istraživanja ka razotkrivanju različitih aspekata regulacije hidroksimetilacije DNK odnosno regulacije aktivnosti TET proteina. Sa druge strane, PARilacija igra važnu ulogu u brojnim procesima u ćeliji među koje se od skoro ubraja i uticaj na epigenetičke mehanizme. Novija istraživanja dovela su u vezu TET proteine i PARP-1 ali za sada nije moguće jednoznačno utvrditi efekat koji PARilacija ima na proces hidroksimetilacije i demetilacije DNK.

Istraživanje sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije predstavlja doprinos rasvetljavanju uticaja koji PARP-1 ostvaruje putem PARilacije na TET-posredovanu hidroksimetilaciju DNK i time potencijalno i na demetilaciju DNK. U tu svrhu ispitana je *in cellulo* i *in vitro* povezanost TET proteina i PARP-1 kao i efekat PARilacije na aktivnost TET1 u pogledu oksidacije 5mC do 5hmC. Funkcionalna uloga TET-PARP interakcije, osim na globalnom nivou, proverena je i na primeru epigenetičke regulacije ekspresije *Cxcl12* gena koji je uključen u brojne fiziološke i patološke procese kao što su razviće, preživljavanje ćelija, reparacija i regeneracija tkiva kao i oboljenja poput kancera i dijabetesa (Liu i Habener, 2009; Ratajczak i sar., 2006).

5.1. Interakcija TET proteina sa PARP-1 i PAR polimerima

Visok stepen kolokalizacije TET1 i PARP-1 u jedru kao i njihova obostrana ko-imunoprecipitacija jasno su pokazali da TET1 i PARP-1 proteini stupaju u

interakciju u jedrima NIH3T3 ćelija. Osim toga, u finalnim eksperimentima pokazano je da i TET2 može stupiti u interakciju sa PARP-1 proteinom u NIH3T3 ćelijama. U skladu sa tim, dve publikacije su na različite načine ukazale na interakciju TET proteina sa PARP-1. Naime, pokazano je da rekombinantni TET1 protein eksprimiran u HEK293T ćelijama interaguje sa endogenim PARP-1, kao i da sva tri člana TET familije, eksprimirani u rekombinantnoj formi, kolokalizuju i interaguju sa rekombinantnim PARP-1 proteinom (Müller i sar., 2014). Pored toga, endogeno prisutni TET1 i PARP-1 proteini interaguju u HEK293T ćelijama dok je u *in vitro* uslovima potvrđeno i da se ova interakcija može uspostaviti direktno, bez posredovanja drugih proteina (Ciccarone i sar., 2015).

PARP-1 je glavni predstavnik PARP familije proteina ujedno i najaktivniji u pogledu PARilacije koja predstavlja posttranslacionu modifikaciju ciljnih proteina. Da bi došlo do PARilacije, PARP-1 stupa u interakciju sa proteinima koje će zatim kovalentno izmeniti, tako da svi interagujući partneri sa PARP-1 potencijalno mogu biti podložni PARilaciji. U ovoj tezi pokazano je da rekombinantni katalitički domen mišjeg TET1 zaista može biti PARilovan *in vitro*, što je u skladu sa istraživanjem koje je pokazalo da rekombinantni katalitički domen humanog TET1 takođe podleže PARilaciji u *in vitro* uslovima (Ciccarone i sar., 2015). U okviru ovde prikazanog istraživanja po prvi put je utvrđeno da i katalitički domen mišjeg TET2 podleže *in vitro* PARilaciji.

Iako precizna pozicija PARilacije TET proteina još uvek nije poznata ipak se mogu napraviti pretpostavke o užem regionu koji obuhvata ciljno mesto PARilacije. Rekombinantni mišji TET1, korišćen u prikazanim eksperimentima, obuhvata samo katalitički domen (amino kiseline 1367-2038) u okviru koga je nestrukturirani region koji se nalazi između dva dela skruktuiranog DSBH domena. Poznato je da ovakvi nestrukturirani regioni često učestvuju u uspostavljanju protein-protein interakcija zbog svoje fleksibilnosti, a takođe su podložni i posttranslacionim modifikacijama (Babu, 2016). Pretpostavlja se da i kod TET proteina ovaj nestrukturirani region može imati ulogu u interakciji sa drugim proteinima (Pastor i sar., 2013) a već je pokazano i da je vrlo podložan posttranslacionim modifikacijama kao što su fosforilacija i O-GlcNAc glikozilacija (Bauer i sar., 2015). Sa druge strane, kod katalitičkog domena mišjeg TET2 proteina ovaj nestrukturirani region je duži i njegovo prisustvo znatno otežava proceduru prečišćavanja (Ravichandran, 2017) tako da je u eksperimentima korišćen

rekombinantni katalitički domen mišjeg TET2 (amino kiseline 1044-1920) kod koga je nestrukturirani region (amino kiseline 1407-1766) zamenjen kratkim nizom od 15 glicin i serin amino kiselina. Na osnovu toga se može zaključiti da je detektovana PARilacija TET2 morala biti pozicionirana u okviru strukturiranih regiona. Najzastupljenije tačkaste mutacije humanog TET2 koje se javljaju kod pacijenata obolelih od leukemija, dovode do narušavanja njegove katalitičke aktivnosti i grupišu se u okviru ovih dobro struktuiranih delova katalitičkog domena i to na njegovoj površini (Hu i sar., 2013; Huang i Rao, 2014). Pretpostavlja se da upravo bočne grupe tih amino kiselina na površini katalitičkog domena, koje su važne za enzimsku funkciju, mogu učestvovati u protein-protein interakcijama i biti ciljna mesta posttranslacionih modifikacija (Huang i Rao, 2014) pa se može očekivati i da su neke od tih pozicija ujedno i ciljna mesta PARilacije.

Poznato je da brojni proteini imaju po dva i više mesta podložnih PARilaciji (Zhen i sar., 2017) tako da PARilacija u okviru katalitičkog domena ne isključuje mogućnost da i drugi regioni TET proteina, pre svega na N-terminusu, mogu imati dodatna mesta PARilacije. N-terminus i nestrukturirani umetak katalitičkog domena obuhvataju najviše mesta fosforilacije i O-GlcNAc glikozilacije (Bauer i sar., 2015), dok su u okviru N-terminusa detektovana i dva mesta acetilacije važna za regulaciju enzimske aktivnosti (Y. W. Zhang i sar., 2017). Upravo zato bi se moglo očekivati da se i u ovom regionu nađu i druge posttranslacione modifikacije poput PARilacije. Sve iznesene pretpostavke mogu poslužiti kao smernice u budućim istraživanjima kako bi se tačno utvrdile aminokiselinske pozicije PARilacije TET proteina i u tu svrhu će svakako biti neophodno uključiti analize masenom spektrometrijom koja predstavlja najprecizniju metodu za mapiranje posttranslacionih modifikacija.

Pored toga što PARilacija predstavlja kovalentnu posttranslacionu modifikaciju, brojni proteini mogu stupiti i u nekovalentnu interakciju sa PAR polimerima. Postoji više različitih proteinskih motiva i domena koji pokazuju afinitet ka nekovalentnom vezivanju za PAR među kojima je PBM najrasprostranjeniji. Iako prisustvo PBM predstavlja samo indikaciju ali ne i garanciju nekovalentne interakcije sa PAR polimerima (Gagné i sar., 2008) kod mišjeg TET1 i TET2 je potvrđeno da upravo peptidni fragmenti koji nose ovaj motiv interaguju sa PAR polimerima (Fujiki i sar., 2013). Najveći afinitet ka PAR polimerima kod mišjeg TET1 i TET2 pokazuje region

5.2. Uticaj PARilacije na aktivnost TET1

PARilacija je posttranslaciona modifikacija koja može značajno izmeniti elektrostatičke i topološke karakteristike modifikovanog proteina što dalje može uticati na njegovu enzimsku aktivnost (Zhen i Yu, 2018). Do sada nije jednoznačno utvrđeno kakav je uticaj PARilacije na aktivnost TET enzima usled njihove kompleksne povezanosti. Naime, primećeno je da inhibicija PARilacije dovodi do smanjenja nivoa 5hmC u DNK HEK239T ćelija dok sam jedarni lizat ovih ćelija, u *in vitro* esej, pokazuje pojačanu hidroksilaciju metilovanog DNK supstrata, nakon istog tretmana PARP inhibitorima (Ciccarone i sar., 2015). Osim toga, u *in vitro* eksperimentima pokazano je da PARilacija rekombinantnog katalitičkog domena humanog TET1 dovodi do stimulacije njegove aktivnosti dok nekovalentna interakcija sa PAR polimerima ima suprotan, inhibitorski efekat na aktivnost TET1 (Ciccarone i sar., 2015). Već je pomenuto da nekovalentna interakcija sa PAR polimerima služi i za regrutovanje TET proteina na određene lokacije u hromatinu (Fujiki i sar., 2013) što može dodatno zakomplikovati utvrđivanje efekata PARilacije na aktivnost TET enzima. Zbog toga su Ciccarone i saradnici (2015) dizajnirali eksperiment u kom su onemogućili regrutovanje TET1 preko PAR polimera, bez narušavanja sposobnosti nekovalente interakcije sa PAR polimerima, tako što su koristili konstrukte TET1 proteina fuzionisanog sa DNK-vezujućim domenima specifičnim za određene nasumično rasprostranjene sekvence. U uslovima prekomerne ekspresije ovog fuzionog konstrukta, inhibicija PARilacije dovela je do pojačane globalne hidroksimetilacije. S obzirom da je primećeni efekat isključivo posledica izmenjene aktivnosti TET1 a ne i njegovog regrutovanja od strane PAR polimera, na osnovu ovog eksperimenta, pretpostavlja se da PARilacija ima inhibitorski uticaj na enzimsku aktivnost TET1 proteina *in vivo* (Ciccarone i sar., 2015, 2017). U skladu sa tim, u ovoj tezi pokazano je da PARilacija od strane PARP-1 proteina ostvaruje negativan uticaj na aktivnost TET1 proteina *in vitro*. Naime, PARilacija rekombinantnog katalitičkog domena mišjeg TET1 dovela je do izmenjene kinetike enzimske aktivnosti, odnosno smanjenja početne brzine oksidacije 5mC do 5hmC od strane TET1. Osim toga, primećeno je da porast nivoa PARilacije, uzrokovan povećanom koncentracijom PARP-1, dovodi do progresivnog pada u aktivnosti TET1 što dodatno potvrđuje inhibitorsku ulogu ove posttranslacione modifikacije na aktivnost TET1. Treba imati u vidu da reakcija *in vitro* PARilacije TET1 ne isključuje mogućnost

da pojedinačni TET1 proteini interaguju i nekovalentno sa PAR polimerima prisutnim na drugim TET1 i PARP-1 proteinima u reakcionoj smeši, te da i ovaj vid interakcije može doprineti ukupnom efektu. Shodno tome i u *in vivo* uslovima može se očekivati da dolazi do preplitanja kovalentne PARilacije TET1 i njegove nekovalentne interakcije sa PAR polimerima.

5.3. Globalni uticaj PARP-1 i PARilacije na TET-posredovanu demetilaciju DNK

Literaturni podaci ukazuju na to da se TET i PARP-1 proteini nalaze u kompleksnom odnosu međusobne interakcije koja nema jednoznačan ishod. Rezultati prikazani u ovoj tezi ipak upućuju na potencijalno inhibitorni uticaj koji PARP-1 i PARilacija imaju na aktivnost TET1 enzima, *in vitro*. Kako bi se dodatno razjasnio uticaj koji PARP-1 i PARilacija ostvaruju na aktivnost TET1 enzima u procesima hidroksimetilacije i demetilacije DNK, u *in cellulo* eksperimentima koristila se PARP -/- ćelijska linija sa uklonjenim genom za PARP-1 kao i inhibicija PARilacije koja se postigla tretmanom NIH3T3 ćelija sa niraparibom. Na taj način se ispitivao uticaj i prisustva i aktivnosti PARP-1 na TET-posredovanu demetilaciju DNK.

5.3.1. PARP-1 i ekspresija ključnih enzima u procesima (de)metilacije DNK

U odsustvu PARP-1 proteina, u PARP-/- ćelijama primetno je smanjen nivo PARilacije ali ne dolazi do njenog potpunog odsustva. Iako PARilacija u ćelijama u najvećoj meri potiče od PARP-1 proteina (Bai, 2015), u PARP-/- ćelijama, detektovana PARilacija bi se mogla pripisati enzimskoj aktivnosti PARP-2 proteina koji takođe ima sposobnost PARilacije ciljnih proteina ali ima i zasebne uloge u odnosu na PARP-1 (Yélamos i sar., 2008). Ipak, PARP-2, u odsustvu PARP-1, može delimično nadoknaditi njegov nedostatak svojom aktivnošću (Hanzlikova i sar., 2017; Ménissier de Murcia i sar., 2003).

Više istraživanja ukazalo je na moguću ulogu PARP-1 i PARilacije na ekspresiju gena koji kodiraju enzime ključne za procese (de)metilacije DNK. Iako PARP-1 može da se veže za promotor *Dnmt1* gena i pozitivno utiče na njegovu transkripciju svojom

enzimskom aktivnošću (Zampieri i sar., 2009), u ovoj tezi nije uočena promena ekspresije *Dnmt1* gena u odsustvu PARP-1. Ovaj rezultat nije iznenađujuć s obzirom da PARilacija ne ostvaruje uvek pomenuti efekat, te tako u mišjim primordijalnim germinativnim ćelijama nema promene u ekspresiji *Dnmt1* nakon inhibicije PARilacije (Ciccarone i sar., 2012). Takođe, u eksperimentima u okviru ove disertacije nije došlo ni do značajne promene u ekspresiji drugih DNK metiltransferaza, *Dnmt3a* i *Dnmt3b* u odsustvu PARP-1. Međutim, u odsustvu PARP-1, ustanovljen je značajan porast ekspresije *Tet1* i *Tet2* gena što ukazuje na negativan efekat koji PARP-1 može imati na ekspresiju oba *Tet* gena. Najviše eksprimirani proteini TET familije u NIH3T3 ćelijama su TET1 i TET2 (Fujiki i sar., 2013) a utišavanje *Tet1* gena dovodi do značajnog pada 5hmC u istim ćelijama (Kudo i sar., 2012), što upućuje na to da su ovi proteini funkcionalno značajni za NIH3T3 ćelijsku liniju. Dobijeni rezultat o negativnom uticaju PARP-1 na ekspresiju *Tet* gena je u suprotnosti sa istraživanjima koja su pokazala da PARP-1 i PARilacija mogu pozitivno uticati na ekspresiju *Tet1* i *Tet2* gena (Ciccarone i sar., 2014, 2012; Roper i sar., 2014). Naime, ustanovljeno je da u nekim ćelijskim linijama humanih kancera, utišavanje gena za PARP-1 i/ili PARP-2, inhibicija PARilacije ili uklanjanje postojećih PAR polimera PARG enzimom mogu dovesti do smanjenja nivoa ekspresije *Tet1* gena (Ciccarone i sar., 2014). Kod mišjih embrionalnih ćelija dolazi do pada u ekspresiji *Tet1* i *Tet2* gena usled uklanjanja gena za PARP-1 (Roper i sar., 2014), a u mišjim primordijalnim germinativnim ćelijama inhibicija PARilacije negativno utiče na ekspresiju *Tet1* gena ali nema efekta na ekspresiju *Tet2* gena (Ciccarone i sar., 2012). Treba imati u vidu da je regulacija ekspresije gena od strane PARP-1 i PARilacije kompleksan proces koji može zavisti od brojnih faktora. Poznato je da PARP-1 može na različite načine uticati na transkripciju ciljnih gena: modulacijom strukture hromatina, direktnim vezivanjem za specifične DNK sekvence ili strukture u okviru promotora i regulatornih sekvenci gena, interakcijom sa drugim transkripcionim regulatorima kao kofaktor ili interakcijom sa insulatorom (Kim i sar., 2005; Kraus, 2008; Kraus i Lis, 2003). Transkripciona regulacija može i ne mora zavisti od njegove enzimske aktivnosti odnosno PARilacije (Kim i sar., 2005; Kraus, 2008; Kraus i Lis, 2003). Iako se češće ističe uloga PARP-1 u aktivaciji ekspresije gena, postoje i primeri gena kod kojih PARP-1 ostvaruje negativan uticaj na ekspresiju (Frizzell i sar., 2009; Kim i sar., 2005; Kraus, 2008; Kraus i Lis, 2003). Takođe,

pokazano je da PARP-1 može biti prisutan kao koregulator i represivnog i aktivatorskog kompleksa u okviru istog gena, gde može imati važnu ulogu u zameni inhibitornih sa stimulatornim kofaktorima u odgovoru na određeni signal (Ju i sar., 2006, 2004; Pavri i sar., 2005).

Osim toga, Ciccarone i saradnici (2014) su primetili da uticaj PARP-1 na regulaciju ekspresije *Tet1* gena zavisi od nivoa *Tet1* ekspresije u određenoj ćelijskoj liniji, odnosno da PARP-1 ima stimulatorni efekat na ekspresiju *Tet1* u ćelijskim linijama sa višim nivoom ekspresije *Tet1* ali nema uticaja u ćelijskim linijama u kojima je niži nivo ekspresije *Tet1* gena. Usled upotrebe različitih referentnih gena za relativnu kvantifikaciju nije bilo moguće direktno uporediti te rezultate sa nivoom ekspresije *Tet1* gena u NIH3T3 i PARP-/- ćelijama korišćenim u ovoj tezi ali ovaj podatak svakako ukazuje na kompleksan uticaj koji PARP-1 ostvaruje na regulaciju transkripcije *Tet1* gena. Takođe, autori koriste HEK293T *PARP-1* utišane ćelije u kojima PARP-1 nije u potpunosti uklonjen već je prisutan u maloj količini. U ovoj tezi korišćena je ćelijska linija u kojoj ekspresija *Tet1* nije puno izražena a takođe i ćelijska linija u kojoj je gen za PARP-1 u potpunosti isključen, što može da objasni različite rezultate. U prilog negativnom uticaju koji PARP-1 ima na ekspresiju *Tet* gena idu i pokazani rezultati povećane hidrosimetilacije u odsustvu PARP-1, detektovane na HALO preparatima.

5.3.2. Uticaj PARP-1 i PARilacije na globalni nivo metilacije i hidrosimetilacije DNK

Prvi radovi koji su dovodili u vezu PARP-1 i aktivnu demetilaciju DNK pre svega su se osvrtni na ulogu PARP-1 u BER koja može predstavljati finalni korak u ovom procesu. Inicijalno je, kao glavni primer aktivne demetilacije, smatrana demetilacija do koje dolazi u muškom pronukleusu nakon formiranja zigota kao i demetilacija DNK u razviću PGC koja dovodi do uklanjanja metilacionih obeležja roditeljskog imprintinga gena. Postoje podaci da upravo ove procese demetilacije DNK prati povećan nivo PARP-1 i PAR polimera (Ciccarone i sar., 2012; Hajkova i sar., 2010; Wossidlo i sar., 2010). Pored toga, pokazano je da inhibicija PARilacije dovodi do povećanja globalnog nivoa metilacije DNK u muškom pronukleusu mišjeg zigota (Hajkova i sar., 2010) kao i do povećanja lokalnog nivo metilacije u okviru H19 diferencijalno metilovanog regiona u PGC (Kawasaki i sar., 2015) što je tumačeno kao

potvrda učešća BER u aktivnoj demetilaciji u ovim ćelijama. Inhibicija PARilacije korišćena je i kako bi se dokazalo učešće BER u lokalnoj aktivnoj demetilaciji određenih lokusa kod embrionalnih stem ćelija (Okashita i sar., 2014) kao i kod HEK293 ćelijske linije (Guo i sar., 2011). Međutim, u većini radova u kojima se demetilacija dovodi u vezu sa BER preko inhibicije PARilacije, autori se nisu osvrtni na potencijalne dodatne uticaje koje PARP proteini mogu ostvariti na (de)metilaciju DNK, već je unapred smatrano da inhibicija PARilacije primarno predstavlja inhibiciju BER puta. Osim toga, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno u kojoj meri je aktivna demetilacija, koja podrazumeva BER kao finalni korak demetilacije, uključena u uklanjanje 5mC. Za sada se na osnovu postojećih dokaza ističe da je uloga BER, koja započinje aktivnošću TDG enzima, ključna za demetilaciju kod ćelija koje se nalaze u procesu diferencijacije (Cortázar i sar., 2011; Cortellino i sar., 2011; Schuermann i sar., 2016). Ipak, smatra se da do globalne demetilacije velikih razmera u najvećoj meri dolazi pasivnim procesima zavisnim od replikacije (što može da uključuje i TET-posredovan kombinovani aktivno-pasivni put demetilacije) a da je aktivna demetilacija koja uključuje i BER primarno zadužena za uklanjanje 5mC na lokalnom nivou, kod pojedinačnih lokusa odnosno imprintovanih diferencijalno metilovanih regiona (Kagiwada i sar., 2013; Schuermann i sar., 2016; Seisenberger i sar., 2012). Učešće BER kao finalnog koraka aktivne demetilacije na globalnom nivou bi podrazumevalo formiranje velikog broja reparacionih DNK intermedijera što bi potencijalno ugrozilo stabilnost i integritet genoma ćelije (Schuermann i sar., 2016). Ipak, detaljnijim ispitivanjem na osnovu efekta pretretmana PGC inhibitorom PARilacije utvrđeno je da PARP-1 može učestvovati u aktivnoj demetilaciji u PGC i nezavisno od BER (Ciccarone i sar., 2012). U tom istraživanju pokazano je da samo pre-tretman dovodi do značajnog porasta globalnog nivoa metilacije dok kasnija inhibicija BER kombinacijom inhibitora PARilacije i APE1 enzima ne menja nivo 5mC (Ciccarone i sar., 2012). Zaista, ako se detaljnije rasčlani proces aktivne demetilacije postaje jasnije da, u slučaju inhibicije BER dolazi do zaustavljanja u finalnom koraku demetilacije što znači da je onemogućeno uklanjanje 5fC i 5caC. Upravo zato ne mora doći do promene u nivou 5mC i 5hmC već bi bilo očekivano da dođe do akumulacije 5fC i 5caC. Dakle, logično je da promena u nivou metilacije DNK nakon tretmana inhibitorima PARilacije ukazuje na uticaj koji PARP i PARilacija ostvaruju ili na

DNMT enzime koji uspostavljaju metilaciju ili na prvi korak demetilacije, odnosno TET-posredovanu oksidaciju 5mC do 5hmC.

Rezultati eksperimenata u okviru ove teze pokazali su da inhibicija PARilacije kao i odsustvo PARP-1 dovode do značajnog smanjenja globalnog nivoa metilacije i izraženog povećanja globalnog nivoa hidrosimetilacije u NIH3T3 ćelijama tretiranim niraparibom i PARP-/- ćelijama. Ovakav rezultat upućuje na uticaj na početne faze (de)metilacije a ne na inhibiciju BER kao finalnog koraka aktivne demetilacije DNK. Eventualni uticaj PARilacije na BER najbolje bi se proverio merenjem nivoa 5fC i 5caC ali za to nisu postojale tehničke mogućnosti tokom ovog istraživanja. Imajući u vidu prethodno pomenute pretpostavke o ograničenom učešću BER u globalnoj demetilaciji, ovde ćemo se osvrnuti pre svega na uticaj PARilacije na početne faze (de)metilacije. Poznato je da nekovalentna interakcija sa PAR polimerima može negativno da utiče na aktivnost DNMT1 enzima (Reale i sar., 2005) ali kako je smanjena PARilacija uzrokovala pad u nivou metilacije jasno je da u model sistemu korišćenom u ovoj tezi PARP-1 i PARilacija ne inhibiraju DNMT1. Pomenuto je i da nema promene u ekspresiji *Dnmt1* gena tako da primećeni efekti sveukupno ne potiču od uticaja na ovaj protein. Sa druge strane, detektovani porast u hidrosimetilaciji u kombinaciji sa padom metilacije DNK jasno ukazuju na to da se efekti odsustva PARP-1 i inhibicije PARilacije ostvaruju preko TET enzima. Na osnovu povećane ekspresije *Tet1* i *Tet2* u odsustvu PARP-1 kao i na osnovu rezultata koji su pokazali inhibitorni uticaj PARP-1 zavisne PARilacije na TET1 aktivnost *in vitro*, može se zaključiti da PARP-1 i PARilacija mogu imati negativan uticaj na TET-posredovanu demetilaciju na globalnom nivou *in cellulo*. Treba napomenuti da postoji starije istraživanje u kom je detektovano povećanje metilacije heterohromatinskih regiona NIH3T3 ćelija kod tretmana PARP inhibitorom 3AB (Capoa i sar., 1999). Međutim, kako je u pomenutom radu meren samo metilovani heterohromatin i nije obuhvaćena ukupna metilacija u posmatranim jedrima, ovi rezultati nisu uporedivi sa rezultatima koji su dobijeni u okviru ove teze. Kako se radi o istraživanju starom punih 20 godina, metoda kvantifikacije korišćena u pomenutom radu nije izrazito precizna i u novijim radovima se više ne koristi, jer su razvijeni bolji eksperimentalni pristupi, tako da se može smatrati da je kvantifikacija urađena u ovoj tezi znatno preciznija i verodostojnija. Ipak, ovde prikazani rezultati jesu u suprotnosti sa više istraživanja u kojima je detektovan

porast metilacije na lokalnom ili globalnom nivou prilikom inhibicije PARilacije (Caiafa i sar., 2009; Ciccarone i sar., 2014, 2012; Hajkova i sar., 2010; Kawasaki i sar., 2015). U eksperimentalnom modelu zebra ribica kod kojih je indukovan diabetes mellitus inhibicija PARilacije neutrališe porast globalnog nivoa 5hmC koji je izazvan hiperglikemijom, ukazujući na pozitivnu uloga PARilacije u demetilaciji DNK (Dhliwayo i sar., 2014) što je takođe u suprotnosti sa prikazanim rezultatima ove teze. Ipak, tretman PARP inhibitorom ne dovodi do promene u nivou 5hmC u bazalnim uslovima, prilikom tretmana zdravih kontrolnih ribica (Dhliwayo i sar., 2014), što govori u prilog tome da PARilacija može imati različite efekte u okviru istog organizma u zavisnosti od uslova sredine. Interesanto je i da u HEK293 ćelijama inhibicija PARilacije ne utiče na nivo 5hmC (Guo i sar., 2011) dok kod tretiranih HEK293T ćelija (koje su izvedene iz HEK293 transformacijom specifičnim virusnim antigenom) dolazi do pada u nivou 5hmC iako jedarni lizati ovih ćelija tretirani inhibitorima PARilacije pokazuju porast TET hidroksilazne aktivnosti u *in vitro* eseju (Ciccarone i sar., 2015). To ukazuje da PARilacija najverovatnije ima negativan efekat na TET aktivnost, što je pokazano i u ovoj tezi, ali da neto efekat u ćeliji može biti i suprotan usled dodatnih uticaja koje PAR polimeri mogu da ostvare u pogledu regulacije ekspresije *Tet* gena kao i regrutovanja TET proteina (Ciccarone i sar., 2015). Postoje i drugi literaturni podaci koji ukazuju da PARP-1 i PARilacija mogu ostvariti i negativan efekat na demetilaciju DNK pa je tako primećeno da kod ćelija fotoreceptora koji su u fazi umiranja dolazi do hipermetilacije koja koincidira sa izuzetno pojačanom PARP aktivnošću (Wahlin i sar., 2013). Takođe, je pokazano da PARP-1 učestvuje u održavanju metilacije rDNK u NIH3T3 i HEK293T ćelijama (Guetg i sar., 2012). Naime, ispostavilo se da je PARP-1 u velikoj meri vezan za metilovane sekvence promotora gena za rRNK i to posebno u NIH3T3 ćelijama (Guetg i sar., 2012). Utišavanje gena za PARP-1 dovelo je do pada u metilaciji promotora rRNK gena u NIH3T3 i HEK293T ćelijama a sličan efekat je primećen i u uslovima prekomerne ekspresije mutiranog PARP-1 koji nema mogućnost PARilacije, dok je, suprotno tome, prekomerna ekspresija funkcionalnog PARP-1 dovela do pojačane metilacije rRNK promotora (Guetg i sar., 2012). Održavanje metilacije ovog lokusa od strane aktivnog PARP-1 moglo bi biti posledica sprečavanja demetilacije usled inhibitorynog uticaja PARP-1 i PARilacije na aktivnosti TET proteina. Kompleksnost uticaja PARilacije na metilacioni status potvrđena je i u novijoj studiji u

kojoj je, nakon inhibicije PARilacije u MCF7 ćelijskoj liniji, mikroerej metodom analizirana metilacija širom genoma (Nalabothula i sar., 2015). Ispostavilo se da je u okviru pojedinačnih lokusa inhibicija PARilacije dovela do različitih promena u metilaciji DNK. Nakon inhibicije PARilacije detektovana je hipermetilacija kod 72% a hipometilacija kod 28% analiziranih lokusa, iako istovremeno nije izmenjen ukupan globalni nivo metilacije (Nalabothula i sar., 2015). Ovaj podatak ukazuje na postojanje dodatnih faktora koji omogućavaju da PARilacija ostvaruje suprotne lokalne efekte na (de)metilaciju DNK čak i u okviru iste ćelijske linije. Interesantno bi bilo u budućnosti paralelno ispitati i nivo 5hmC kao i 5fC i 5caC kod ovih diferencijalno metilovanih regiona.

Nepodudaranje efekata koje PAR polimeri ostvaruju na TET proteine u različitim istraživanjima može biti posledica regulacije TET proteina kombinacijom više posttranslacionih modifikacija katalitičkog domena i N-terminusa. Postoji kompleksna međuzavistnost određenih posttranslacionih modifikacija kod TET proteina (Bauer i sar., 2015; Y. W. Zhang i sar., 2017). Neke posttranslacione modifikacije se na određenim pozicijama javljaju zajedno dok su druge modifikacije međusobno isključive pa tako acetilacija TET2 inhibira ubikvitinaciju dok O-glcNac sprečava fosforilaciju određenih amino kiselina TET proteina (Bauer i sar., 2015; Y. W. Zhang i sar., 2017). Sasvim je moguće da PARilacija u kombinaciji ili kompeticiji sa drugim modifikacijama može ostvarivati različite neto efekte na TET aktivnost u različitim model sistemima. Osim toga, ne treba izgubiti iz vida ni kompleksnost uticaja same PARilacije. Naime, poznato je da nekovalentna interakcija sa PAR polimerima kao i efekti ove interakcije mogu zavisiti od dužine i razgranatosti PAR polimera dok ove osobine polimera i same zavise od ćelijskog konteksta, načina aktivacije PARP proteina kao i degradacije polimera (Fahrer i sar., 2010, 2007; Nottbohm i Hergenrother, 2006; Teloni i Altmeyer, 2016). Dakle, mnoštvo uticaja koji istovremeno deluju kod određenog tipa ćelija i sredinskih uslova u kombinaciji sa dinamičnom prirodom posttranslacionih modifikacija kao i protein-protein interakcija, stvaraju kompleksnu sliku i mogu uzrokovati razlike u eksperimentalnim ishodima različitih model sistema.

5.4. Funkcionalna povezanost TET i PARP proteina u regulaciji ekspresije *Cxcl12* gena

Nakon analize globalnih efekata PARP-1 i PARP-zavisne PARilacije na TET enzime i demetilaciju DNK bilo je potrebno proveriti i funkcionalni značaj međusobne povezanosti TET i PARP-1 proteina na lokalnom nivo na primeru jednog gena. Za ispitivanje lokalnog uticaja PARP-1 na demetilaciju DNK, potencijalno posredovanu TET proteinima, izabran je *Cxcl12* gen jer je u našoj laboratoriji u ranijem istraživanju već pokazano da je ekspresija ovog gena pod negativnim uticajem PARP-1 proteina (Marković i sar., 2013). Uz to, već je poznato i da je *CXCL12* epigenetički regulisan metilacijom CpG dinukleotida u okviru promotora (Kubarek i Jagodzinski, 2007; Wendt i sar., 2006). Zato je cilj bio da se ispita da li negativan uticaj PARP-1 na ekspresiju *Cxcl12* gena ima epigenetičku pozadinu odnosno da li se odvija putem metilacije ovog gena. Sa porastom interesovanja i količine informacija o epigenetičkoj regulaciji dosta pažnje je posvećeno ulozi epigenetičkih modifikacija u progresiji maligniteta (Jones i Baylin, 2002). Povećan metastatski potencijal u nekim tipovima kancera dovodi se u vezu sa utišavanjem *CXCL12* gena putem metilacije DNK (Ramos i sar., 2010; Wendt i sar., 2006, 2008; Zhou i sar., 2009). Osim toga, imajući u vidu sposobnost *CXCL12* da stimuliše rast i preživljavanje β -ćelija pankreasa, mogućnost transkripcione regulacije ovog hemokina može predstavljati novi pristup u tretmanu dijabetesa (Vidaković i sar., 2015). Jedan od mogućih pristupa bi mogla predstavljati terapija koja bi uticala na ekspresiju *CXCL12* putem (de)metilacije pa je zato vrlo važno odrediti koji sve faktori utiču na metilacioni status ovog gena.

Rezultati ove teze jasno su potvrdili ranije ustanovljen inhibitorni uticaj PARP-1 na ekspresiju *Cxcl12*. Naime, u PARP-/- ćelijama detektovan je značajan porast u ekspresiji *Cxcl12* gena u poređenju sa NIH3T3 ćelijama, što je praćeno i povećanjem u količini *CXCL12* proteina izlučenog u medijum u kom su gajene PARP-/- u odnosu na NIH3T3 ćelije. Porast ekspresije *Cxcl12* nakon tretmana NIH3T3 ćelija jednim od najčešće korišćenih demetilacionih agenasa, 5aza (Christman, 2002; Christman i sar., 1983), ukazuje na to da u ovim ćelijama metilacija DNK utišava ekspresiju *Cxcl12*. Demetilacija *Cxcl12* promotora je očekivana obzirom da je već ustanovljeno da je *CXCL12* gen podložan epigenetičkoj regulaciji putem metilacije C u CpG

dinukleotidima lociranim u promotorskoj sekvenci (Kubarek i Jagodzinski, 2007; Wendt i sar., 2006). Šta više, u okviru ove teze ustanovljeno je da je *Cxcl12* gen kod NIH3T3 ćelija metilovan ne samo u okviru promotora i TSS već i na granici između egzona i introna i u okviru prvog introna, odnosno u različitim regionima tela gena koje obuhvata CpG ostrvce. Interesantno je da je u PARP^{-/-} ćelijama detektovan značajan pad u nivou metilacije u svim analiziranim regionima. Najveći nivo demetilacije izmeren je u okviru egzon/intron granice sa metilacionim indeksom za ovaj region koji je bio čak oko 1000 puta veći kod NIH3T3 u odnosu na PARP^{-/-} ćelije. Zanimljivo je da je u već pomenutom istraživanju u kom je analiziran metilacioni status širom genoma (Nalabothula i sar., 2015), pokazano da je kod gena, koji su hipometilovani nakon inhibicije PARilacije, značajan udeo hipometilacije detektovan upravo u okviru tela gena a ne samo u promotoru i u blizini TSS.

Prethodni rezultati, istakli su negativan uticaj PARP-1 na aktivnost TET1 kao i porast u ekspresiji *Tet* ali ne i *Dnmt* gena, kod PARP^{-/-} u odnosu na NIH3T3 ćelije. Imajući u vidu da je promena u *Tet* ekspresiji praćena padom globalnog nivoa metilacije i porastom nivoa hidrosimetilacije, razmotren je isti scenario i u slučaju *Cxcl12* gena - da je detektovani pad u metilacionom indeksu (ispitivanih regiona *Cxcl12* gena) u PARP^{-/-} ćelijama, posledica aktivne demetilacije i učešća TET proteina. Stoga je sledeći cilj bio da se ustanovi da li je TET-posredovana demetilacija *Cxcl12* potencijalno odgovorna za porast ekspresije ovog gena u odsustvu PARP-1. Kako bi se proverilo da li je TET aktivnost barem u izvesnoj meri uključena u regulaciju ekspresije *Cxcl12* gena, ćelije su tretirane aktivatorom (VitC) i inhibitorom (DMOG) TET enzima. Poznato je da Vit C pojačava TET-zavisnu demetilaciju u embrionalnim stem ćelijama i povećava nivo 5hmC tako što pospešuje recikliranje Fe²⁺ (odnosno redukciju Fe³⁺ do Fe²⁺) koji je neophodan za katalitičku aktivnost TET proteina (Blaschke i sar., 2013; Chung i sar., 2010; Hore i sar., 2016). Sa druge strane, DMOG je mali molekul koji predstavlja analog 2-oksoglutarata i kao takav inhibira enzime familje 2-oksoglutarat zavisnih dioksigenaza, a poznato je da inhibitorno utiče i na enzimsku aktivnost TET proteina koji pripadaju ovoj familiji (Yuan i sar., 2014; J. Zhang i sar., 2017). Kod NIH3T3 ćelija, nijedan tretman nije značajno uticao na ekspresiju *Cxcl12*. Moguće je, da zbog izuzetno niskog nivoa ekspresije *Cxcl12*, promene u ekspresiji nakon tretmana nisu bile dovoljno velike da bi bile detektovane. Pored toga, u NIH3T3 ćelijama niži je i

nivo *Tet* ekspresije što bi moglo ograničiti jačinu efekata koji ostvaruju aktivator i inhibitor TET aktivnosti. Takođe, moguće je da prisustvo PARP-1 u NIH3T3 ćelijama i njegov inihibitorni uticaj na TET, ostvaruju dominantnan efekat u odnosu na tretmane aktivatorom ili inhibitorom TET aktivnosti što ove tretmane čini neefikasnim i njihov uticaj zanemarljivim. Nasuprot tome, u PARP-/- ćelijama, u kojima je PARP-1 odsustan a ekspresija *Tet* i *Cxcl12* znatno veća nego u NIH3T3 ćelijama, tretman VitC doveo je do značajnog porasta ekspresije *Cxcl12* dok je tretman DMOG značajno smanjio ekspresiju ovog gena. Sveukupno rezultati ovog eksperimenta ukazuju da bi ekspresija *Cxcl12* mogla biti pozitivno regulisana od strane TET-posredovane demetilacije do koje dolazi u odsustvu PARP-1. Ipak, treba napomenuti da VitC i DMOG nisu selektivni aktivator i inhibitor TET aktivnosti tako da ovi efekti potencijalno mogu biti posledica i drugih uticaja koje tretmani ovim supstancama mogu ostvariti u ćeliji.

Kako bi se utvrdilo da li TET proteini zaista mogu učestvovati u regulaciji ekspresije *Cxcl12* provereno je prisustvo TET1 i TET2 u okviru promotora ovog gena. Iako su oba TET proteina detektovana u okviru promotora samo je za TET2 ustanovljeno stabilno povećano prisustvo u PARP-/- ćelijama dok za TET1 nije uočena jasna razlika između NIH3T3 i PARP-/- ćelija. Ovo svakako ne isključuje mogućnost da i TET1 učestvuje u demetilaciji *Cxcl12* gena, imajući u vidu da je već pokazano da njegova aktivnost može biti inhibirana od strane PARP-1. Ipak, povećano prisustvo TET2 u odsustvu PARP-1 ukazuje da bi ovaj protein TET familije mogao imati važniju ulogu u regulaciji ekspresije *Cxcl12* u PARP-/- ćelijama. Članovi TET familije proteina na različite načine postižu vezivanje za DNK, pa tako TET1 može biti regrutovan putem direktnog vezivanja CXXC domena za CpG bogate sekvence (Williams i sar., 2012; Xu i sar., 2011; Zhang i sar., 2010) dok TET2 ne poseduje CXXC DNK-vezujući domen pa je verovatnije da je njegovo pozicioniranje na specifičnim genima posredovano interakcijom sa drugim DNK vezujućim faktorima (Chen i sar., 2018; Rasmussen i Helin, 2016). Poznato je da katalitički domen TET2 interaguje sa IDAX proteinom koji se, preko svog CXXC domena, vezuje za nemetilovane CpG dinukleotide u okviru promotora brojnih gena ali nezavisno od nukleotidne sekvence (Ko i sar., 2013). Interesantno je da ova interakcija dovodi do degradacije TET2 proteina mehanizmom u koji su uključene kaspaze (Ko i sar., 2013). U nedavno objavljenom istraživanju opisan je novi mehanizam usmeravanja TET2 ka specifičnim promotorima (Chen i sar., 2018).

Predložen je model u kom transkripcioni koaktivator SNIP1 ima ulogu da poveže TET2 sa c-MYC proteinom koji ima sposobnost vezivanja za specifične DNK sekvence (Chen i sar., 2018). Na taj način SNIP1 olakšava regrutovanje TET2 na ciljne gene c-MYC proteina i pospešuje njihovu demetilaciju a time i ekspresiju (Chen i sar., 2018). Osim toga, poznato je da posttranslaciona modifikacija monoubikvitinacija TET2, katalizovana od strane CRL4VprBP E3 ligaze, stabilizuje vezivanje TET2 za DNK zahvaljujući tome što je mesto monoubikvitinacije u direktnom kontaktu sa DNK (Hu i sar., 2013; Nakagawa i sar., 2015).

Iako postoji nekoliko istraživanja koja dovode u vezu TET2 i PARP proteine njihova direktna interakcija i međusobni uticaj nisu detaljno ispitivani. Do sada je pokazano da TET2 i PARP-1 zajedno učestvuju u epigenetičkoj regulaciji tokom reprogramiranja somatskih ćelija ali sa zasebnim ulogama (Doerge i sar., 2012) kao i da TET2 ima sposobnost nekovalentne interakcije sa PAR polimerima preko Cys bogatog regiona u okviru kog se nalaze dva očuvana PAR vezujuća motiva (Fujiki i sar., 2013). Interesantno je da kod hematopoetskih stem i progenitorskih ćelija, kojima je uklonjen *Tet2* gen, nakon obnovljene ekspresije *Tet2* dolazi do porasta PARP-1 ekspresije (Cimmino i sar., 2017). Već je pomenuto i da TET2 i PARP-1 interaguju u HEK293T ćelijama (Müller i sar., 2014) pa nije iznenađujuć rezultat dobijen u ovoj tezi koji potvrđuje postojanje njihove interakcije. Treba istaći da je u okviru istraživanja u ovoj tezi po prvi put pokazano da TET2 može biti *in vitro* PARilovan od strane PARP-1 proteina. Na taj način je ustanovljena direktna funkcionalna povezanost TET2 i PARP-1 proteina. To dalje može da otvori put istraživanja uticaja PARP-1 i na druge članove TET familije što bi predstavljalo doprinos u rasvetljavanju uticaja PARP-1 na proces demetilacije. Ovi rezultati, zajedno sa podacima o povećanoj ekspresiji i aktivnosti TET proteina kao i intenzivnijem regrutovanju TET2 na promotor *Cxcl12* gena u odsustvu PARP-1, ukazuju na inhibitornu ulogu PARP-1 u regulaciji genske ekspresije *Cxcl12* preko TET-posredovane demetilacije DNK, što objašnjava povećanu ekspresiju *Cxcl12* gena.

Sumirano, inhibitorni uticaj koji PARP-1 može imati na aktivnost TET enzima u procesu demetilacije DNK pokazan je na globalnom nivou a funkcionalnost lokalnih efekata međusobne povezanosti TET i PARP enzima u procesu (de)metilacije ustanovljena je i lokalno na primeru *Cxcl12* gena.

5.5. Smernice za buduća istraživanja

Iako je u prikazanom model sistemu u ovoj tezi jasno pokazana negativna regulacija TET-posredovane hidroksimetilacije i demetilacije DNK od strane PARP-1 proteina i PAR polimera, na osnovu drugih literaturnih podataka jasno je da je veza TET i PARP proteina nije obavezno jednoznačna te da ishodi ove interakcije zavise od ukupnog uticaja više različitih i ponekad funkcionalno suprotnih faktora. Upravo zato je važno nastaviti sa rasvetljavanjem povezanosti PARilacije i hidroksimetilacije u različitim sistemima na globalnom i lokalnom nivou. U budućim istraživanjima potrebno je detaljno proveriti potencijalnu povezanost sva tri člana TET familije sa PARP-1. Osim toga, iznenađujuće je da za sada nema nikavih podataka o potencijalnom uticaju PARP-2 na TET proteine i hidroksimetilaciju iako deo PARilacije u ćelijama potiče upravo od ovog proteina. Zato bi budućim istraživanjima svakako trebalo ustanoviti da li PARP-2 interaguje sa TET proteinima i koja bi bila uloga ove interakcije.

Dodavno bi trebalo ispitati i funkcionalnu ulogu TET2 u regulaciji *Cxcl12* u relevantnim patološkim stanjima. Poznato je da kod pacijenata obolelih od dijabetesa postoji veći rizik od pojave malignih transformacija (Giovannucci i sar., 2010; Ohkuma i sar., 2018; Wu i sar., 2018). U potencijalnoj povezanosti ovih oboljenja može učestvovati TET2 čije se mutacije i smanjena aktivnost vezuju za nastanak kancera (Cimmino i sar., 2017; Ficiz i Gribben, 2014; Hu i sar., 2013; Ko i sar., 2010; Lian i sar., 2012; Wu i sar., 2018). Fosforilacijom TET2 od strane AMPK postiže se njegova stabilizacija što dovodi do povećanog nivoa 5hmC (Wu i sar., 2018). U dijabetesu, hiperglikemija dovodi do narušavanja aktivnosti AMPK pa samim tim i destabilizacije i smanjenja aktivnosti TET2 usled odsustva fosforilacije (Wu i sar., 2018). Osim toga, pokazano je da tretman ćelijskih linija insulinom pojačava acetilaciju TET2 koja, kao i pomenuta fosforilacija, pozitivno utiče na njegovu aktivnost (Y. W. Zhang i sar., 2017). Smanjena produkcija insulina ili oslabljena osetljivost ćelija na insulin mogli bi takođe negativno uticati na aktivnost TET2. Dakle, u dijabetesu može doći do narušavanja aktivnosti TET2 što dalje povećava šansu za razvoj malignih transformacija. S obzirom da je u ovoj tezi pokazano da je ekspresija *Cxcl12*, koji ima brojne uloge u dijabetesu i malignim oboljenjima (Ramos i sar., 2010; Wendt i sar., 2008, 2006; Zhou i sar., 2009), regulisana od strane TET2 bilo bi interesantno u budućim istraživanjima ispitati postoji

li dodatna veza ovih oboljenja preko TET2-posredovane regulacije ekspresije *Cxcl12* gena.

Interesantno je da tretman VitC, kao aktivatorom TET proteina, pojačava osetljivost humanih ćelijskih linija leukemije na PARP inhibiciju (Cimmino i sar., 2017). Značajno smanjeno preživljavanje ćelija pri kombinaciji tretmana VitC i inhibitorom PARilacije pripisuje se ulozi koju PARP ima u procesu uklanjanja 5fC i 5caC putem BER. Međutim, moguće je da dodatni ili čak glavni efekat kombinovanog tretmana predstavlja direktni uticaj inhibicije PARilacije na TET proteine. Iako nije poznat tačan mehanizam inhibitornog uticaja PARilacije na TET, koji je ustanovljen u ovoj tezi, može se pretpostaviti da se inhibicija postiže usled konformacionih promena i promena u nalektrisanju TET proteina koji su kovalentno PARilovani i/ili u nekovalentnoj interakciji sa PAR polimerima. Kod humanih ćelijskih linija leukemije, tretman inhibitorom PARilacije smanjio bi ovaj negativni uticaja na TET što bi u kombinaciji sa bržim recikliranjem Fe^{2+} u prisustvu VitC moglo rezultirati kumulativnim porastom TET aktivnosti te pojačanom hidrosimetilacijom odnosno demetilacijom DNK. U budućim eksperimentima bilo bi korisno proveriti nivo svih modifikacija citozina nakon tretmana kombinacijom VitC i PARP inhibitora kako bi se detaljnije ispitao mehanizam kojim ovakav tretman dovodi do smanjene vijabilnosti ćelijskih linija leukemije.

Novija istraživanja ukazala su i na neočekivanu ulogu TET-posredovane hidrosimetilacije u popravci oštećenja DNK (Chen i sar., 2018; Jiang i sar., 2017; Kafer i sar., 2016; Lejart i sar., 2018). Naime, pokazano je da se 5hmC akumulira na prekidima DNK kao i da su TET proteini važni za očuvanje integriteta genoma jer učestvuju u prevenciji pogrešne segregacije hromozoma indukovane oštećenjima DNK (Kafer i sar., 2016). Osim toga, ustanovljeno je da TET2 učestvuje u regulaciju odgovora na oštećenja u DNK preko TET2-SNIP1-c-MYC puta odnosno regulacije ekspresije c-MYC ciljnih gena (Chen i sar., 2018). Podaci postoje i za TET3-posredovanu demetilacija DNK za koju se ispostavilo da igra važnu ulogu u ATR zavisnom odgovoru na oštećenja DNK (Jiang i sar., 2017). Sa druge strane, PARP proteini i PARilacija predstavljaju izuzeno važne faktore u detekciji i popravci oštećenja DNK (Ray Chaudhuri i Nussenzweig, 2017). Pored toga što PARP može uticati na TET aktivnost, što je dokazano i u ovoj tezi, pokazano je i da TET1 može stimulisati

aktivnost PARP-1 (Ciccarone i sar., 2015). Postoje indikacije i da PARP-1 i PARP-2 proteini imaju sposobnost specifičnog prepoznavanja i vezivanja za 5hmC ali ne i 5mC (Spruijt i sar., 2013). Imajući u vidu sve ove podatke otvara se mogućnost za dodatne uloge TET-PARP interakcije u mehanizmima reparaciji DNK što bi svakako trebalo ispitati u budućim istraživanjima.

6. ZAKLJUČCI

- TET proteini stupaju u interakciju sa PARP-1 i PAR polimerima *in vitro* i *in cellulo*, što se može zaključiti na osnovu:
 - kolokalizacije TET1 i PARP-1 i međuproteinske TET1-PARP-1 interakcije, *in cellulo*.
 - PARP-1-zavisne kovalentne PARilacije TET1 i nekovalentne interakcije TET1 sa PAR polimerima, *in vitro*.
 - TET2 i PARP-1 interakcije *in cellulo* i PARilacije TET2 od strane PARP-1 *in vitro*.
- PARP-1-zavisna PARilacija negativno utiče na kinetiku aktivnosti TET1 *in vitro*, koja se ogleda u njegovoj sposobnosti da oksiduje 5mC do 5hmC.
- PARP-1 i PARilacija negativno utiču na TET-posredovanu demetilaciju na globalnom nivou, što se može zaključiti s obzirom da:
 - u odsustvu PARP-1 dolazi do porasta ekspresije *Tet1* i *Tet2* dok se nivo ekspresije *Dnmt* gena ne menja.
 - u odsustvu PARP-1 kao i u uslovima inhibicije PARilacije dolazi do pada u globalnom nivou metilacije DNK i porasta u globalnom nivou hidrosimetilacije DNK.
- Međusobna povezanost TET i PARP-1 proteina ima funkcionalni značaj za epigenetičku regulaciju ekspresije *Cxcl12*. To se ogleda kroz:
 - povećanu ekspresiju *Cxcl12* i smanjen nivo metilacije promotora ovog gena u odsustvu PARP-1.
 - povećanu/smanjenu ekspresiju *Cxcl12* do koje dolazi usled aktivacije/inhibicije TET aktivnosti, u odsustvu PARP-1.
 - prisustvo TET1 i TET2 na promotoru *Cxcl12* uz povećano regrutovanje TET2 na promotorski region gena u odsustvu PARP-1.

7. LITERATURA

- Akirav, E.M., Lebastchi, J., Galvan, E.M., Henegariu, O., Akirav, M., Ablamunits, V., Lizardi, P.M., Herold, K.C., 2011. Detection of cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 19018–19023.
- Alemasova, E.E., Lavrik, O.I., 2019. Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism i regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* 47, 3811–3827.
- Alvarez-Gonzalez, R., Althaus, F.R., 1989. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents. *Mutat. Res.* 218, 67–74.
- Amouroux, R., Nashun, B., Shirane, K., Nakagawa, S., Hill, P.W., D'Souza, Z., Nakayama, M., Matsuda, M., Turp, A., Ndjetehe, E., Encheva, V., Kudo, N.R., Koseki, H., Sasaki, H., Hajkova, P., 2016. De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nat. Cell Biol.* 18, 225–233.
- Antequera, F., 2005. CpG Islands i Methylation, in: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 1–5.
- Antequera, F., Bird, A., 2018. CpG Islands: A Historical Perspective, in: Vavouri, T., Peinado, M. (Eds.), *CpG Islands. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, pp. 3–13.
- Babu, M.M., 2016. The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, i human disease. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1185–1200.
- Bai, P., 2015. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol. Cell* 58, 947–58.
- Balasubramani, A., Rao, A., 2013. O-GlcNAcylation i 5-methylcytosine oxidation: an unexpected association between OGT i TETs. *Mol. Cell* 49, 618–9.
- Barkauskaite, E., Jankevicius, G., Ladurner, A.G., Ahel, I., Timinszky, G., 2013. The recognition i removal of cellular poly(ADP-ribose) signals. *FEBS J.* 280, 3491–3507.
- Barrès, R., Yan, J., Egan, B., Treebak, J.T., Rasmussen, M., Fritz, T., Caidahl, K., Krook, A., O’Gorman, D.J., Zierath, J.R., 2012. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab.* 15, 405–411.

- Bauer, C., Göbel, K., Nagaraj, N., Colantuoni, C., Wang, M., Müller, U., Kremmer, E., Rottach, A., Leonhardt, H., 2015. Phosphorylation of TET proteins is regulated via O-GlcNAcylation by the O-Linked N-Acetylglucosamine transferase (OGT). *J. Biol. Chem.* 290, 4801–4812.
- Baylin, S.B., 2005. DNA methylation i gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2, S4–S11.
- Beisel, C., Paro, R., 2011. Silencing chromatin: comparing modes i mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 12, 123–135.
- Bhutani, N., Burns, D.M., Blau, H.M., 2011. DNA demethylation dynamics. *Cell* 146, 866–72.
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J., Macleod, D., 1985. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40, 91–9.
- Bird, A.P., 1980. DNA methylation i the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 1499–1504.
- Blaschke, K., Ebata, K.T., Karimi, M.M., Zepeda-Martínez, J. a, Goyal, P., Mahapatra, S., Tam, A., Laird, D.J., Hirst, M., Rao, A., Lorincz, M.C., Ramalho-Santos, M., 2013. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation i a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* 500, 222–6.
- Bochtler, M., Kolano, A., Xu, G.-L., 2017. DNA demethylation pathways: Additional players i regulators. *BioEssays* 39, 1–13.
- Bostick, M., Kim, J.K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., Jacobsen, S.E., 2007. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317, 1760–4.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A.J., Socci, N.D., Scandura, J.M., 2011. DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. *PLoS One* 6, e14524.
- Brown, K.D., Robertson, K.D., 2007. DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability i cell viability. *Nat. Genet.* 39, 289–290.
- Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Kohli, L., Hangoc, G., Lee, Y., Mantel, C., Clapp, D.W., Kim, C.H., 2003. Transgenic expression of stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12 enhances myeloid progenitor cell survival/antiapoptosis in

- vitro in response to growth factor withdrawal i enhances myelopoiesis in vivo. *J. Immunol.* 170, 421–9.
- Caiafa, P., Guastafierro, T., Zampieri, M., 2009. Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J.* 23, 672–8.
- Capoa, A. De, Febbo, F.R., Giovannelli, F., Niveleau, A., Zardo, G., Marenzi, S., Caiafa, P., 1999. Reduced levels of poly(ADP-ribosyl)ation result in chromatin compaction i hypermethylation as shown by cell-by-cell computer-assisted quantitative analysis. *FASEB J.* 13, 89–93.
- Chalmers, A., Johnston, P., Woodcock, M., Joiner, M., Marples, B., 2004. PARP-1, PARP-2, i the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 410–9.
- Chambon, P., Weill, J.D., Mandel, P., 1963. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 39–43.
- Chen, C.-C., Wang, K.-Y., Shen, C.-K.J., 2013. DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 288, 9084–91.
- Chen, C.-C., Wang, K.-Y., Shen, C.-K.J., 2012. The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A i DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *J. Biol. Chem.* 287, 33116–21.
- Chen, L.-L., Lin, H.-P., Zhou, W.-J., He, C.-X., Zhang, Z.-Y., Cheng, Z.-L., Song, J.-B., Liu, P., Chen, X.-Y., Xia, Y.-K., Chen, X.-F., Sun, R.-Q., Zhang, J.-Y., Sun, Y.-P., Song, L., Liu, B.-J., Du, R.-K., Ding, C., Lan, F., Huang, S.-L., Zhou, F., Liu, S., Xiong, Y., Ye, D., Guan, K.-L., 2018. SNIP1 Recruits TET2 to Regulate c-MYC Target Genes i Cellular DNA Damage Response. *Cell Rep.* 25, 1485-1500.e4.
- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z., Li, E., 2003. Establishment i maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a i Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 23, 5594–5605.
- Christman, J.K., 2002. 5-Azacytidine i 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies i their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483–5495.
- Christman, J.K., Mendelsohn, N., Herzog, D., Schneiderman, N., 1983. Effect of 5-

- azacytidine on differentiation i DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res.* 43, 763–9.
- Christman, J.K., Sheikhnejad, G., Marasco, C.J., Sufrin, J.R., 1995. 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7347–7351.
- Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G., Li, B.F., 1997. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277, 1996–2000.
- Chung, T.-L., Brena, R.M., Kolle, G., Grimmond, S.M., Berman, B.P., Laird, P.W., Pera, M.F., Wolvetang, E.J., 2010. Vitamin C Promotes Widespread Yet Specific DNA Demethylation of the Epigenome in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 28, 1848–1855.
- Ciccarone, F., Klinger, F.G., Catizone, A., Calabrese, R., Zampieri, M., Bacalini, M.G., De Felici, M., Caiafa, P., 2012. Poly(ADP-ribosyl)ation Acts in the DNA Demethylation of Mouse Primordial Germ Cells Also with DNA Damage-Independent Roles. *PLoS One* 7, e46927.
- Ciccarone, F., Valentini, E., Bacalini, M.G., Zampieri, M., Calabrese, R., Guastafierro, T., Mariano, G., Reale, A., Franceschi, C., Caiafa, P., 2014. Poly(ADP-ribosyl)ation is involved in the epigenetic control of TET1 gene transcription. *Oncotarget* 5, 10356–67.
- Ciccarone, F., Valentini, E., Zampieri, M., Caiafa, P., 2015. 5mC-hydroxylase activity is influenced by the PARylation of TET1 enzyme. *Oncotarget* 6, 24333–47.
- Ciccarone, F., Zampieri, M., Caiafa, P., 2017. PARP1 orchestrates epigenetic events setting up chromatin domains. *Semin. Cell Dev. Biol.* 63, 123–134.
- Cimmino, L., Dolgalev, I., Wang, Y., Yoshimi, A., Martin, G.H., Wang, J., Ng, V., Xia, B., Witkowski, M.T., Mitchell-Flack, M., Grillo, I., Bakogianni, S., Ndiaye-Lobry, D., Martín, M.T., Guillamot, M., Banh, R.S., Xu, M., Figueroa, M.E., Dickins, R.A., Abdel-Wahab, O., Park, C.Y., Tsirigos, A., Neel, B.G., Aifantis, I., 2017. Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal i Leukemia Progression. *Cell* 170, 1079-1095.e20.
- Cortázar, D., Kunz, C., Selfridge, J., Lettieri, T., Saito, Y., MacDougall, E., Wirz, A., Schuermann, D., Jacobs, A.L., Siegrist, F., Steinacher, R., Jiricny, J., Bird, A.,

- Schär, P., 2011. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature* 470, 419–423.
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., Abramowitz, L.K., Bartolomei, M.S., Rambow, F., Bassi, M.R., Bruno, T., Fanciulli, M., Renner, C., Klein-Szanto, A.J., Matsumoto, Y., Kobi, D., Davidson, I., Alberti, C., Larue, L., Bellacosa, A., 2011. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 146, 67–79.
- de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Walztinger, C., Chambon, P., de Murcia, G., 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice *i in cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7303–7.
- Dehennaut, V., Leprince, D., Lefebvre, T., 2014. O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, *i Polycomb Group Proteins*. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 155.
- Dhaliwayo, N., Sarras, M.P., Luczkowski, E., Mason, S.M., Intine, R. V, 2014. Parp inhibition prevents ten-eleven translocase enzyme activation *i hyperglycemia-induced DNA demethylation*. *Diabetes* 63, 3069–76.
- Di Giammartino, D.C., Shi, Y., Manley, J.L., 2013. PARP1 represses PAP *i inhibits polyadenylation during heat shock*. *Mol. Cell* 49, 7–17.
- Ding, G.-L., Huang, H.-F., 2014. Role for tet in hyperglycemia-induced demethylation: a novel mechanism of diabetic metabolic memory. *Diabetes* 63, 2906–8.
- Dinić, S., Grdović, N., Uskoković, A., Đorđević, M., Mihailović, M., Jovanović, J.A., Poznanović, G., Vidaković, M., 2016. CXCL12 protects pancreatic β -cells from oxidative stress by a Nrf2-induced increase in catalase expression *i activity*. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 92, 436–454.
- Doerge, C. a, Inoue, K., Yamashita, T., Rhee, D.B., Travis, S., Fujita, R., Guarnieri, P., Bhagat, G., Vanti, W.B., Shih, A., Levine, R.L., Nik, S., Chen, E.I., Abeliovich, A., 2012. Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 *i Tet2*. *Nature* 488, 652–5.
- Döring, Y., Pawig, L., Weber, C., Noels, H., 2014. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front. Physiol.* 5, 212.

- Drew, Y., 2015. The development of PARP inhibitors in ovarian cancer: from bench to bedside. *Br. J. Cancer* 113 Suppl, S3-9.
- Duncan, B.K., Miller, J.H., 1980. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* 287, 560–1.
- Fahrer, J., Kranaster, R., Altmeyer, M., Marx, A., Bürkle, A., 2007. Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Res.* 35, e143.
- Fahrer, J., Popp, O., Malanga, M., Beneke, S., Markovitz, D.M., Ferrando-May, E., Bürkle, A., Kappes, F., 2010. High-affinity interaction of poly(ADP-ribose) i the human DEK oncoprotein depends upon chain length. *Biochemistry* 49, 7119–30.
- Ficz, G., Gribben, J.G., 2014. Loss of 5-hydroxymethylcytosine in cancer: Cause or consequence? *Genomics* 104, 352–357.
- Frizzell, K.M., Gamble, M.J., Berrocal, J.G., Zhang, T., Krishnakumar, R., Cen, Y., Sauve, A.A., Kraus, W.L., 2009. Global Analysis of Transcriptional Regulation by Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 i Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 284, 33926–33938.
- Fujiki, K., Shinoda, A., Kano, F., Sato, R., Shirahige, K., Murata, M., 2013. PPAR γ -induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Commun.* 4, 2262.
- Gagné, J.-P., Isabelle, M., Lo, K.S., Bourassa, S., Hendzel, M.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Poirier, G.G., 2008. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins i poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res.* 36, 6959–76.
- Gehring, M., Reik, W., Henikoff, S., 2009. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet.* 25, 82–90.
- Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., Regensteiner, J.G., Yee, D., 2010. Diabetes i Cancer: A consensus report. *Diabetes Care* 33, 1674–1685.
- Grdović, N., Dinić, S., Mihailović, M., Uskoković, A., Jovanović, J.A., Poznanović, G., Wagner, L., Vidaković, M., 2014. CXC chemokine ligand 12 protects pancreatic β -cells from necrosis through Akt kinase-mediated modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity. *PLoS One* 9, e101172.

- Grdović, N., Rajić, J., Petrović, S.M., Dinić, S., Uskoković, A., Mihailović, M., Jovanović, J.A., Tolić, A., Pucar, A., Milašin, J., Vidaković, M., 2016. Association of CXCL12 gene promoter methylation with periodontitis in patients with diabetes mellitus type 2. *Arch. Oral Biol.* 72, 124–133.
- Guastafierro, T., Catizone, A., Calabrese, R., Zampieri, M., Martella, O., Bacalini, M.G., Reale, A., Di Girolamo, M., Micheli, M., Farrar, D., Klenova, E., Ciccarone, F., Caiafa, P., 2013. ADP-ribose polymer depletion leads to nuclear Ctf re-localization i chromatin rearrangement. *Biochem. J.* 449, 623–630.
- Guastafierro, T., Cecchinelli, B., Zampieri, M., Reale, A., Riggio, G., Sthandier, O., Zupi, G., Calabrese, L., Caiafa, P., 2008. CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *J. Biol. Chem.* 283, 21873–80.
- Guetg, C., Scheifele, F., Rosenthal, F., Hottiger, M.O., Santoro, R., 2012. Inheritance of Silent rDNA Chromatin Is Mediated by PARP1 via Noncoding RNA. *Mol. Cell* 45, 790–800.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., Song, H., 2011. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423–34.
- Gupte, R., Liu, Z., Kraus, W.L., 2017. PARPs i ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev.* 31, 101–126.
- Ha, H.C., Snyder, S.H., 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13978–82.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., Surani, M.A., 2002. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 117, 15–23.
- Hajkova, P., Jeffries, S.J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S.P., Surani, M.A., 2010. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science* 329, 78–82.
- Hanzlikova, H., Gittens, W., Krejcikova, K., Zeng, Z., Caldecott, K.W., 2017. Overlapping roles for PARP1 i PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 i PNKP into oxidized chromatin. *Nucleic Acids Res.* 45, 2546–2557.
- Hassa, P.O., Hottiger, M.O., 2008. The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front. Biosci.* 13,

3046–82.

- Heeres, J.T., Hergenrother, P.J., 2007. Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 644–653.
- Hermann, A., Goyal, R., Jeltsch, A., 2004. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* 279, 48350–9.
- Hill, P.W.S., Amouroux, R., Hajkova, P., 2014. DNA demethylation, Tet proteins i 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: An emerging complex story. *Genomics* 104, 324–333.
- Hore, T.A., von Meyenn, F., Ravichandran, M., Bachman, M., Ficiz, G., Oxley, D., Santos, F., Balasubramanian, S., Jurkowski, T.P., Reik, W., 2016. Retinol i ascorbate drive erasure of epigenetic memory i enhance reprogramming to naïve pluripotency by complementary mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 12202–12207.
- Hossain, M.B., Ji, P., Anish, R., Jacobson, R.H., Takada, S., 2009. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 interacts with nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) i plays a role in NRF-1 transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 8621–8632.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Lüscher, B., Schüler, H., Koch-Nolte, F., 2010. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 35, 208–219.
- Hu, L., Li, Z., Cheng, J., Rao, Q., Gong, W., Liu, M., Shi, Y.G., Zhu, J., Wang, P., Xu, Y., 2013. Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation. *Cell* 155, 1545–55.
- Hu, X., Dai, S., Wu, W.-J., Tan, W., Zhu, X., Mu, J., Guo, Y., Bolli, R., Rokosh, G., 2007. Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis. *Circulation* 116, 654–63.
- Huang, Y., Rao, A., 2014. Connections between TET proteins i aberrant DNA modification in cancer. *Trends Genet.* 30, 464–74.
- Illingworth, R.S., Bird, A.P., 2009. CpG islands - ‘A rough guide.’ *FEBS Lett.* 583, 1713–1720.
- Inoue, A., Shen, L., Dai, Q., He, C., Zhang, Y., 2011. Generation i replication-

- dependent dilution of 5fC i 5caC during mouse preimplantation development. *Cell Res.* 21, 1670–6.
- Ison, G., Howie, L.J., Amiri-Kordestani, L., Zhang, L., Tang, S., Sridhara, R., Pierre, V., Charlab, R., Ramamoorthy, A., Song, P., Li, F., Yu, J., Manheng, W., Palmby, T.R., Ghosh, S., Horne, H.N., Lee, E.Y., Philip, R., Dave, K., Chen, X.H., Kelly, S.L., Janoria, K.G., Banerjee, A., Eradiri, O., Dinin, J., Goldberg, K.B., Pierce, W.F., Ibrahim, A., Kluetz, P.G., Blumenthal, G.M., Beaver, J.A., Pazdur, R., 2018. FDA Approval Summary: Niraparib for the Maintenance Treatment of Patients with Recurrent Ovarian Cancer in Response to Platinum-Based Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 24, 4066–4071.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Carolina, N., Hill, C., Swenberg, J. a, He, C., Zhang, Y., 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine i 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–3.
- Iyer, L.M., Tahiliani, M., Rao, A., Aravind, L., 2009. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative i other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* 8, 1698–710.
- Jang, H.S., Shin, W.J., Lee, J.E., Do, J.T., 2017. CpG i Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation i Brain Function. *Genes (Basel)*. 8, 148.
- Janssens, R., Struyf, S., Proost, P., 2018. The unique structural i functional features of CXCL12. *Cell. Mol. Immunol.* 15, 299–311.
- Jiang, D., Wei, S., Chen, F., Zhang, Y., Li, J., 2017. TET3-mediated DNA oxidation promotes ATR-dependent DNA damage response. *EMBO Rep.* 18, 781–796.
- Jin, C., Qin, T., Barton, M.C., Jelinek, J., Issa, J.-P.J., 2015. Minimal role of base excision repair in TET-induced global DNA demethylation in HEK293T cells. *Epigenetics* 10, 1006–13.
- Jones, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies i beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13, 484–92.
- Jones, P.A., Baylin, S.B., 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–428.
- Ju, B.-G., Lunyak, V. V, Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2006. A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312, 1798–802.

- Ju, B.-G., Solum, D., Song, E.J., Lee, K.-J., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2004. Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase II δ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* 119, 815–29.
- Jungmichel, S., Rosenthal, F., Altmeyer, M., Lukas, J., Hottiger, M.O., Nielsen, M.L., 2013. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Mol. Cell* 52, 272–85.
- Kafer, G.R., Li, X., Horii, T., Suetake, I., Tajima, S., Hatada, I., Carlton, P.M., 2016. 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage i Promotes Genome Stability. *Cell Rep.* 14, 1283–1292.
- Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H., Razin, A., 1992. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo i germ line. *Genes Dev.* 6, 705–714.
- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., Saitou, M., 2013. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J.* 32, 340–53.
- Kanai, M., Hanashiro, K., Kim, S.-H., Hanai, S., Boulares, A.H., Miwa, M., Fukasawa, K., 2007. Inhibition of Crm1–p53 interaction i nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosyl)ation. *Nat. Cell Biol.* 9, 1175–1183.
- Kangaspeka, S., Stride, B., Métivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R.P., Benes, V., Gannon, F., Reid, G., 2008. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452, 112–5.
- Kawasaki, Y., Lee, J., Matsuzawa, A., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., 2015. Active DNA demethylation is required for complete imprint erasure in primordial germ cells. *Sci. Rep.* 4, 3658.
- Kim, G., Ison, G., McKee, A.E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T., Sridhara, R., Lee, E., Tzou, A., Philip, R., Chiu, H.-J., Ricks, T.K., Palmby, T., Russell, A.M., Ladouceur, G., Pfuma, E., Li, H., Zhao, L., Liu, Q., Venugopal, R., Ibrahim, A., Pazdur, R., 2015. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 21, 4257–4261.
- Kim, M.Y., Zhang, T., Kraus, W.L., 2005. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: “PAR-

- laying” NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.* 19, 1951–67.
- Ko, M., An, J., Bandukwala, H.S., Chavez, L., Aijö, T., Pastor, W.A., Segal, M.F., Li, H., Koh, K.P., Lähdesmäki, H., Hogan, P.G., Aravind, L., Rao, A., 2013. Modulation of TET2 expression i 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature* 497, 122–6.
- Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A.M., Pape, U.J., Tahiliani, M., Bandukwala, H.S., An, J., Lamperti, E.D., Koh, K.P., Ganetzky, R., Liu, X.S., Aravind, L., Agarwal, S., Maciejewski, J.P., Rao, A., 2010. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468, 839–43.
- Kohli, R.M., Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG i the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472–9.
- Kraus, W.L., 2008. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, i insulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 294–302.
- Kraus, W.L., Lis, J.T., 2003. PARP goes transcription. *Cell* 113, 677–83.
- Krishnakumar, R., Kraus, W.L., 2010. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, i clinical targets. *Mol. Cell* 39, 8–24.
- Kubarek, Ł., Jagodzinski, P.P., 2007. Epigenetic up-regulation of CXCR4 i CXCL12 expression by 17 β-estradiol i tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 581, 1441–1448.
- Kudo, Y., Tateishi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Asaoka, Y., Ijichi, H., Nagae, G., Yoshida, H., Aburatani, H., Koike, K., 2012. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci.* 103, 670–676.
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., Reik, W., 2003. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *genesis* 35, 88–93.
- Langelier, M.-F., Pascal, J.M., 2013. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 134–43.
- Langelier, M.-F., Planck, J.L., Roy, S., Pascal, J.M., 2012. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science* 336, 728–32.
- Langelier, M.-F., Planck, J.L., Roy, S., Pascal, J.M., 2011. Crystal Structures of

- Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Zinc Fingers Bound to DNA. *J. Biol. Chem.* 286, 10690–10701.
- Langelier, M.-F., Riccio, A.A., Pascal, J.M., 2014. PARP-2 i PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* 42, 7762–75.
- Law, J. a, Jacobsen, S.E., 2010. Establishing, maintaining i modifying DNA methylation patterns in plants i animals. *Nat. Rev. Genet.* 11, 204–20.
- Lejart, A., Salbert, G., Huet, S., 2018. Cytosine hydroxymethylation by TET enzymes: From the control of gene expression to the regulation of DNA repair mechanisms, i back. *AIMS Biophys.* 5, 182–193.
- Li, B., Wang, Zhan, Wu, H., Xue, M., Lin, P., Wang, S., Lin, N., Huang, X., Pan, W., Liu, M., Yan, X., Qu, H., Sun, L., Li, H., Wu, Y., Teng, W., Wang, Zenan, Zhou, X., Chen, H., Poznansky, M.C., Ye, Z., 2018. Epigenetic Regulation of CXCL12 Plays a Critical Role in Mediating Tumor Progression i the Immune Response In Osteosarcoma. *Cancer Res.* 78, 3938–3953.
- Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R., 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.
- Lian, C.G., Xu, Y., Ceol, C., Wu, F., Larson, A., Dresser, K., Xu, W., Tan, L., Hu, Y., Zhan, Q., Lee, C.-W., Hu, D., Lian, B.Q., Kleffel, S., Yang, Y., Neiswender, J., Khorasani, A.J., Fang, R., Lezcano, C., Duncan, L.M., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., Kakavand, H., Houvras, Y., Zon, L.I., Mihm, M.C., Kaiser, U.B., Schatton, T., Woda, B.A., Murphy, G.F., Shi, Y.G., Shi, Y.G., 2012. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* 150, 1135–46.
- Lister, R., Mukamel, E.A., Nery, J.R., Urich, M., Puddifoot, C.A., Johnson, N.D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A.J., Schultz, M.D., Yu, M., Tonti-Filippini, J., Heyn, H., Hu, S., Wu, J.C., Rao, A., Esteller, M., He, C., Haghghi, F.G., Sejnowski, T.J., Behrens, M.M., Ecker, J.R., 2013. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341, 1237905.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B., Ecker, J.R., 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic

- differences. *Nature* 462, 315–22.
- Liu, S., Wang, J., Su, Y., Guerrero, C., Zeng, Y., Mitra, D., Brooks, P.J., Fisher, D.E., Song, H., Wang, Y., 2013. Quantitative assessment of Tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine in cellular i tissue DNA. *Nucleic Acids Res.* 41, 6421–6429.
- Liu, Z., Habener, J.F., 2009. Stromal cell-derived factor-1 promotes survival of pancreatic beta cells by the stabilisation of beta-catenin i activation of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2). *Diabetologia* 52, 1589–98.
- Loeffler, P.A., Cuneo, M.J., Mueller, G.A., DeRose, E.F., Gabel, S.A., London, R.E., 2011. Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC Struct. Biol.* 11, 37.
- Lonskaya, I., Potaman, V.N., Shlyakhtenko, L.S., Oussatcheva, E.A., Lyubchenko, Y.L., Soldatenkov, V.A., 2005. Regulation of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 by DNA Structure-specific Binding. *J. Biol. Chem.* 280, 17076–17083.
- Loseva, O., Jemth, A.-S., Bryant, H.E., Schüler, H., Lehtiö, L., Karlberg, T., Helleday, T., 2010. PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. *J. Biol. Chem.* 285, 8054–60.
- Maiti, A., Drohat, A.C., 2011. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine i 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J. Biol. Chem.* 286, 35334–8.
- Marković, J., Grdović, N., Dinić, S., Karan-Djurašević, T., Uskoković, A., Arambašić, J., Mihailović, M., Pavlović, S., Poznanović, G., Vidaković, M., Markovic, J., Grdovic, N., Dinic, S., Karan-Djurasevic, T., Uskokovic, A., Arambasic, J., Mihailovic, M., Pavlovic, S., Poznanovic, G., Vidakovic, M., 2013. PARP-1 i YY1 are important novel regulators of CXCL12 gene transcription in rat pancreatic beta cells. *PLoS One* 8, e59679.
- Marković, J., Uskoković, A., Grdović, N., Dinić, S., Mihailović, M., Jovanović, J.A., Poznanović, G., Vidaković, M., 2015. Identification of transcription factors involved in the transcriptional regulation of the CXCL12 gene in rat pancreatic insulinoma Rin-5F cell line. *Biochem. Cell Biol.* 93, 54–62.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E., 2003. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302, 890–3.

- Maunakea, A.K., Nagarajan, R.P., Bilenky, M., Ballinger, T.J., D'Souza, C., Fouse, S.D., Johnson, B.E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V.M., Rowitch, D.H., Xing, X., Fiore, C., Schillebeeckx, M., Jones, S.J., Haussler, D., Marra, M.A., Hirst, M., Wang, T., Costello, J.F., 2010. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466, 253–257.
- McCann, K.E., Hurvitz, S.A., 2018. Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. *Drugs Context* 7, 212540.
- Medvedeva, Y.A., Fridman, M. V, Oparina, N.J., Malko, D.B., Ermakova, E.O., Kulakovskiy, I. V, Heinzl, A., Makeev, V.J., 2010. Intergenic, gene terminal, i intragenic CpG islands in the human genome. *BMC Genomics* 11, 48.
- Ménissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Amé, J.-C., Dierich, A., LeMeur, M., Sabatier, L., Chambon, P., de Murcia, G., 2003. Functional interaction between PARP-1 i PARP-2 in chromosome stability i embryonic development in mouse. *EMBO J.* 22, 2255–63.
- Métivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Péron, C., Jurkowska, R.Z., Carmouche, R.P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F., Salbert, G., 2008. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452, 45–50.
- Minor, E.A., Court, B.L., Young, J.I., Wang, G., 2013. Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J. Biol. Chem.* 288, 13669–74.
- Müller, U., Bauer, C., Siegl, M., Rottach, A., Leonhardt, H., 2014. TET-mediated oxidation of methylcytosine causes TDG or NEIL glycosylase dependent gene reactivation. *Nucleic Acids Res.* 42, 8592–8604.
- Murai, J., Huang, S.N., Das, B.B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshov, J.H., Ji, J., Takeda, S., Pommier, Y., 2012. Trapping of PARP1 i PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.* 72, 5588–99.
- Nagasawa, T., 2014. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) i its receptor CXCR4. *J. Mol. Med.* 92, 433–439.
- Nagasawa, T., Kikutani, H., Kishimoto, T., 1994. Molecular cloning i structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2305–9.

- Nakagawa, T., Lv, L., Nakagawa, M., Yu, Y., Yu, C., D'Alessio, A.C., Nakayama, K., Fan, H.-Y., Chen, X., Xiong, Y., 2015. CRL4(VprBP) E3 ligase promotes monoubiquitylation i chromatin binding of TET dioxygenases. *Mol. Cell* 57, 247–260.
- Nalabothula, N., Al-jumaily, T., Eteleeb, A.M., Flight, R.M., Xiaorong, S., Moseley, H., Rouchka, E.C., Fondufe-Mittendorf, Y.N., 2015. Genome-wide profiling of PARP1 reveals an interplay with gene regulatory regions i DNA methylation. *PLoS One* 10, e0135410.
- Nottbohm, A.C., Hergenrother, P.J., 2006. The Promises i Pitfalls of Small-Molecule Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG), in: *Drug Discovery Research*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 163–185.
- Ohkuma, T., Peters, S.A.E., Woodward, M., 2018. Sex differences in the association between diabetes i cancer: a systematic review i meta-analysis of 121 cohorts including 20 million individuals i one million events. *Diabetologia* 61, 2140–2154.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a i Dnmt3b are essential for de novo methylation i mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Okashita, N., Kumaki, Y., Ebi, K., Nishi, M., Okamoto, Y., Nakayama, M., Hashimoto, S., Nakamura, T., Sugawara, K., Kojima, N., Takada, T., Okano, M., Seki, Y., 2014. PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Development* 141, 269–80.
- Ooi, S.K.T., Bestor, T.H., 2008. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 133, 1145–8.
- Pastor, W. a, Aravind, L., Rao, A., 2013. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation i transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 341–56.
- Pavri, R., Lewis, B., Kim, T.-K., Dilworth, F.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P., Reinberg, D., 2005. PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol. Cell* 18, 83–96.
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., Althaus, F.R., 2000. Poly(ADP-ribose)

- binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 40974–80.
- Prickett, A.R., Barkas, N., McCole, R.B., Hughes, S., Amante, S.M., Schulz, R., Oakey, R.J., 2013. Genome-wide i parental allele-specific analysis of CTCF i cohesin DNA binding in mouse brain reveals a tissue-specific binding pattern i an association with imprinted differentially methylated regions. *Genome Res.* 23, 1624–35.
- Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C.K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., Godley, L., Opolon, P., Tilly, H., Solary, E., Duffourd, Y., Dessen, P., Merle-Beral, H., Nguyen-Khac, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., Bastard, C., Mercher, T., Bernard, O.A., 2011. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse i is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 20, 25–38.
- Ramos, E.A., Camargo, A.A., Braun, K., Slowik, R., Cavalli, I.J., Ribeiro, E.M., Pedrosa, F. de O., de Souza, E.M., Costa, F.F., Klassen, G., 2010. Simultaneous CXCL12 i ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. *BMC Cancer* 10, 23.
- Rasmussen, K.D., Helin, K., 2016. Role of TET enzymes in DNA methylation , development , i cancer. *Genes Dev.* 30, 733–750.
- Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Reza, R., Wojakowski, W., Ratajczak, J., 2006. The pleiotropic effects of the SDF-1–CXCR4 axis in organogenesis, regeneration i tumorigenesis. *Leukemia* 20, 1915–1924.
- Ravichandran, M., 2017. Biochemical Characterisation of TET DNA Hydroxylases. Dissertation.
- Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., 2017. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair i chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 610–621.
- Reale, A., Matteis, G. De, Galleazzi, G., Zampieri, M., Caiafa, P., 2005. Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* 24, 13–19.
- Roper, S.J., Chrysanthou, S., Senner, C.E., Sienerth, A., Gnan, S., Murray, A., Masutani, M., Latos, P., Hemberger, M., 2014. ADP-ribosyltransferases Parp1 i Parp7 safeguard pluripotency of ES cells. *Nucleic Acids Res.* 42, 8914–27.
- Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., Poirier, G.G., 2010. PARP

- inhibition: PARP1 i beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 293–301.
- Saxonov, S., Berg, P., Brutlag, D.L., 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1412–7.
- Schiesser, S., Hackner, B., Pfaffeneder, T., Müller, M., Hagemeyer, C., Truss, M., Carell, T., 2012. Mechanism i stem-cell activity of 5-carboxycytosine decarboxylation determined by isotope tracing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51, 6516–20.
- Schiller, R., Scozzafava, G., Tumber, A., Wickens, J.R., Bush, J.T., Rai, G., Lejeune, C., Choi, H., Yeh, T.-L., Chan, M.C., Mott, B.T., McCullagh, J.S.O., Maloney, D.J., Schofield, C.J., Kawamura, A., 2014. A cell-permeable ester derivative of the JmjC histone demethylase inhibitor IOX1. *ChemMedChem* 9, 566–71.
- Schuermann, D., Weber, A.R., Schär, P., 2016. Active DNA demethylation by DNA repair: Facts i uncertainties. *DNA Repair (Amst)*. 44, 92–102.
- Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C., Thienpont, B., Dean, W., Reik, W., 2012. The Dynamics of Genome-wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells. *Mol. Cell* 48, 849–862.
- Seisenberger, S., Peat, J.R., Hore, T.A., Santos, F., Dean, W., Reik, W., 2013. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building i breaking epigenetic barriers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20110330.
- Sharp, A.J., Stathaki, E., Migliavacca, E., Brahmachary, M., Montgomery, S.B., Dupre, Y., Antonarakis, S.E., 2011. DNA methylation profiles of human active i inactive X chromosomes. *Genome Res.* 21, 1592–600.
- Shen, L., Kondo, Y., Guo, Y., Zhang, J., Zhang, L., Ahmed, S., Shu, J., Chen, X., Waterland, R.A., Issa, J.-P.J., 2007. Genome-Wide Profiling of DNA Methylation Reveals a Class of Normally Methylated CpG Island Promoters. *PLoS Genet.* 3, e181.
- Shen, L., Wu, H., Diep, D., Yamaguchi, S., D’Alessio, A.C., Fung, H.-L., Zhang, K., Zhang, Y., 2013. Genome-wide analysis reveals TET- i TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell* 153, 692–706.

- Shi, F.T., Kim, H., Lu, W., He, Q., Liu, D., Goodell, M. a., Wan, M., Songyang, Z., 2013. Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by o-linked n-acetylglucosamine transferase (ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 288, 20776–20784.
- Spruijt, C.G., Gnerlich, F., Smits, A.H., Pfaffeneder, T., Jansen, P.W.T.C., Bauer, C., Münzel, M., Wagner, M., Müller, M., Khan, F., Eberl, H.C., Mensinga, A., Brinkman, A.B., Lephikov, K., Müller, U., Walter, J., Boelens, R., van Ingen, H., Leonhardt, H., Carell, T., Vermeulen, M., 2013. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine i its oxidized derivatives. *Cell* 152, 1146–59.
- Stefan-Lifshitz, M., Karakose, E., Cui, L., Ettela, A., Yi, Z., Zhang, W., Tomer, Y., 2019. Epigenetic modulation of β cells by interferon- α via PNPT1/mir-26a/TET2 triggers autoimmune diabetes. *JCI Insight* 4, e126663.
- Stenz, L., Schechter, D.S., Serpa, S.R., Paoloni-Giacobino, A., 2018. Intergenerational Transmission of DNA Methylation Signatures Associated with Early Life Stress. *Curr. Genomics* 19, 665–675.
- Ström, C.E., Johansson, F., Uhlén, M., Szigartyo, C.A.-K., Erixon, K., Helleday, T., 2011. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res.* 39, 3166–75.
- Swartz, M.N., Trautner, T.A., Kornberg, A., 1962. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XI. Further studies on nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acids. *J. Biol. Chem.* 237, 1961–7.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., Rao, A., 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930–5.
- Teicher, B.A., Fricker, S.P., 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 2927–31.
- Teloni, F., Altmeyer, M., 2016. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose. *Nucleic Acids Res.* 44, 993–1006.
- Thaler, R., Spitzer, S., Karlic, H., Klaushofer, K., Varga, F., 2012. DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells.

- Epigenetics 7, 635–51.
- van der Vorst, E.P.C., Döring, Y., Weber, C., 2015. MIF i CXCL12 in Cardiovascular Diseases: Functional Differences i Similarities. *Front. Immunol.* 6, 373.
- Vidaković, M., Grdović, N., Dinić, S., Mihailović, M., Uskoković, A., Arambašić Jovanović, J., 2015. The Importance of the CXCL12/CXCR4 Axis in Therapeutic Approaches to Diabetes Mellitus Attenuation. *Front. Immunol.* 6, 403.
- Vidaković, M., Koester, M., Goetze, S., Winkelmann, S., Klar, M., Poznanović, G., Bode, J., 2005. Co-localization of PARP-1 i lamin B in the nuclear architecture: A halo-fluorescence- i confocal-microscopy study. *J. Cell. Biochem.* 96, 555–568.
- Vidaković, M., Tolić, A., Grdović, N., Ravichandran, M., Jurkowski, T.P., 2018. PARylation, DNA (De)methylation, i Diabetes, in: Patel, V., Preedy, V. (Eds.), *Handbook of Nutrition, Diet, i Epigenetics*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–20.
- Virág, L., Szabó, C., 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 54, 375–429.
- Virág, L., Szabó, C., 2001. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation i modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J.* 15, 99–107.
- Wacker, D.A., Ruhl, D.D., Balagamwala, E.H., Hope, K.M., Zhang, T., Kraus, W.L., 2007. The DNA binding i catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure i transcription. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7475–85.
- Wahlin, K.J., Enke, R.A., Fuller, J.A., Kalesnykas, G., Zack, D.J., Merbs, S.L., 2013. Epigenetics i Cell Death: DNA Hypermethylation in Programmed Retinal Cell Death. *PLoS One* 8, e79140.
- Wang, J., Tang, J., Lai, M., Zhang, H., 2014. 5-Hydroxymethylcytosine i disease. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 762C, 167–175.
- Wang, L., Zhang, Jun, Duan, J., Gao, X., Zhu, W., Lu, X., Yang, L., Zhang, Jing, Li, G., Ci, W., Li, W., Zhou, Q., Aluru, N., Tang, F., He, C., Huang, X., Liu, J., 2014. Programming i Inheritance of Parental DNA Methylomes in Mammals. *Cell* 157, 979–991.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., Schubeler, D., Pääbo, S., Rebhan, M., Schübeler, D., 2007. Distribution, silencing potential i

- evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39, 457–466.
- Wendt, M.K., Cooper, A.N., Dwinell, M.B., 2008. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene* 27, 1461–71.
- Wendt, M.K., Johanesen, P.A., Kang-Decker, N., Binion, D.G., Shah, V., Dwinell, M.B., 2006. Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene* 25, 4986–4997.
- Williams, K., Christensen, J., Helin, K., 2012. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* 13, 28–35.
- Wossidlo, M., Arand, J., Sebastiano, V., Lepikhov, K., Boiani, M., Reinhardt, R., Schöler, H., Walter, J., 2010. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks i repair in mouse zygotes. *EMBO J.* 29, 1877–1888.
- Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C.J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., Walter, J., 2011. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* 2, 241.
- Wu, D., Hu, D., Chen, H., Shi, G., Fetahu, I.S., Wu, F., Rabidou, K., Fang, R., Tan, L., Xu, S., Liu, H., Argueta, C., Zhang, L., Mao, F., Yan, G., Chen, J., Dong, Z., Lv, R., Xu, Y., Wang, M., Ye, Y., Zhang, S., Duquette, D., Geng, S., Yin, C., Lian, C.G., Murphy, G.F., Adler, G.K., Garg, R., Lynch, L., Yang, P., Li, Y., Lan, F., Fan, J., Shi, Y., Shi, Y.G., 2018. Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature* 559, 637–641.
- Wu, H., Zhang, Y., 2014. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, i biological functions. *Cell* 156, 45–68.
- Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A.J., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., Min, J., Nicholson, T., Chen, T., Xu, G., Shi, Y.G.Y., Zhang, K., Shi, Y.G.Y., 2011. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, i gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell* 42, 451–64.
- Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J.G., Bian, C., Hu, Y., Hu, D., Zhao, B., Cerovina, T., Diao, J., Wu, F., He, H.H., Cui, Q., Clark, E., Ma, C., Barbara, A., Veenstra, G.J.C., Xu, G., Kaiser, U.B., Liu, X.S., Sugrue, S.P., He, X., Min, J.,

- Kato, Y., Shi, Y.G., 2012. Tet3 CXXC domain i dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye i neural development. *Cell* 151, 1200–13.
- Yang, H., Liu, Y., Bai, F., Zhang, J.-Y., Ma, S.-H., Liu, J., Xu, Z.-D., Zhu, H.-G., Ling, Z.-Q., Ye, D., Guan, K.-L., Xiong, Y., 2013. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression i 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene* 32, 663–9.
- Yano, T., Liu, Z., Donovan, J., Thomas, M.K., Habener, J.F., 2007. Stromal Cell Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 Attenuates Diabetes in Mice i Promotes Pancreatic β -Cell Survival by Activation of the Prosurvival Kinase Akt. *Diabetes* 56, 2946–2957.
- Yélamos, J., Schreiber, V., Dantzer, F., 2008. Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol. Med.* 14, 169–178.
- Yin, X., Xu, Y., 2016. Structure i Function of TET Enzymes. Springer, Cham, pp. 275–302.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H., 1997. Cytosine methylation i the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13, 335–40.
- Yokochi, T., Robertson, K.D., 2002. Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *J Biol Chem* 277, 11735–11745.
- Yu, S.-W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259–63.
- Yu, W., Ginjala, V., Pant, V., Chernukhin, I., Whitehead, J., Docquier, F., Farrar, D., Tavoosidana, G., Mukhopadhyay, R., Kanduri, C., Oshimura, M., Feinberg, A.P., Lobanenko, V., Klenova, E., Ohlsson, R., 2004. Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat. Genet.* 36, 1105–10.
- Yuan, Q., Bleiziffer, O., Boos, A.M., Sun, J., Brandl, A., Beier, J.P., Arkudas, A., Schmitz, M., Kneser, U., Horch, R.E., 2014. PHDs inhibitor DMOG promotes the vascularization process in the AV loop by HIF-1 α up-regulation i the preliminary discussion on its kinetics in rat. *BMC Biotechnol.* 14, 112.

- Yuen, R.K., Jiang, R., Peñaherrera, M.S., McFadden, D.E., Robinson, W.P., 2011. Genome-wide mapping of imprinted differentially methylated regions by DNA methylation profiling of human placentas from triploidies. *Epigenetics Chromatin* 4, 10.
- Zampieri, M., Passananti, C., Calabrese, R., Perilli, M., Corbi, N., De Cave, F., Guastafierro, T., Bacalini, M.G., Reale, A., Amicosante, G., Calabrese, L., Zlatanova, J., Caiafa, P., 2009. Parp1 localizes within the Dnmt1 promoter i protects its unmethylated state by its enzymatic activity. *PLoS One* 4, e4717.
- Zhang, H., Zhang, X., Clark, E., Mulcahey, M., Huang, S., Shi, Y.G., 2010. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation i gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res.* 20, 1390–1393.
- Zhang, J., Zhang, S., Wang, Y., Cheng, H., Hao, L., Zhai, Y., Zhang, Z., An, X., Ma, X., Zhang, X., Li, Z., Tang, B., 2017. Effect of TET inhibitor on bovine parthenogenetic embryo development. *PLoS One* 12, e0189542.
- Zhang, L., Lu, X., Lu, J., Liang, H., Dai, Q., Xu, G.-L., Luo, C., Jiang, H., He, C., 2012. Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat. Chem. Biol.* 8, 328–330.
- Zhang, Q., Liu, X., Gao, W., Li, P., Hou, J., Li, J., Wong, J., 2014. Differential Regulation of the Ten-Eleven Translocation (TET) Family of Dioxygenases by O - Linked β - N -Acetylglucosamine Transferase (OGT). *J. Biol. Chem.* 289, 5986–5996.
- Zhang, Y.W., Wang, Z., Xie, W., Cai, Y., Xia, L., Easwaran, H., Luo, J., Yen, R.-W.C., Li, Y., Baylin, S.B., 2017. Acetylation Enhances TET2 Function in Protecting against Abnormal DNA Methylation during Oxidative Stress. *Mol. Cell* 65, 323–335.
- Zhen, Y., Yu, Y., 2018. Proteomic Analysis of the Downstream Signaling Network of PARP1. *Biochemistry* 57, 429–440.
- Zhen, Y., Zhang, Y., Yu, Y., 2017. A Cell-Line-Specific Atlas of PARP-Mediated Protein Asp/Glu-ADP-Ribosylation in Breast Cancer. *Cell Rep.* 21, 2326–2337.
- Zhou, W., Jiang, Z., Liu, N., Xu, F., Wen, P., Liu, Y., Zhong, W., Song, X., Chang, X., Zhang, X., Wei, G., Yu, J., 2009. Down-regulation of CXCL12 mRNA expression by promoter hypermethylation i its association with metastatic progression in

human breast carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135, 91–102.

Zhu, J., He, F., Hu, S., Yu, J., 2008. On the nature of human housekeeping genes.

Trends Genet. 24, 481–4.

Biografija

Anja Tolić je rođena 31.05.1988. god. u Beogradu. Osnovnu školu i Matematičku gimnaziju završila je u Beogradu. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2007. god. Osnovne studije je završila 2012. god. sa prosečnom ocenom 9,17 i iste godine upisala master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul humana molekularna biologija. Master rad, urađen na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, pod rukovodstvom dr Aleksandre Uskoković i dr Dušanke Savić-Pavićević, pod naslovom „Analiza metilacionog statusa gena za CXCL12 kod pacova”, odbranila je 2013. god. sa ocenom 10, čime je završila master studije sa prosečnom ocenom 10. Iste godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul molekularna biologija eukariota. Od 2014. god. zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od 2016. god kao istraživač saradnik na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu“, potprojekat “Genetska predispozicija za razvoj dijabetesa tip 1 i novi pristupi u prevenciji disfunkcije beta-ćelija u dijabetesu: izučavanje puteva prenosa signala posredovanih CXCL12” (br. 173020) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Do danas je objavila 8 radova u časopisima međunarodnog značaja i ima 11 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Ања З. Толић**

број индекса **M3002/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Функционална анализа интеракција ТЕТ-посредоване оксидације
5-метилцитозина и PARP-зависне ADP-рибозилације у процесу
деметилације ДНК**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора **Ања З. Толић**

Број индекса **M3002/2013**

Студијски програм **Молекуларна биологија**

Наслов рада **Функционална анализа интеракција ТЕТ-посредоване
оксидације 5-метилцитозина и PARP-зависне ADP-рибозилације у
процесу деметилације ДНК**

Ментор **др Мелита Видаковић и др Александра Ускоковић**

Потписани/а **Ања З. Толић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Функционална анализа интеракција ТЕТ-посредоване оксидације 5-метилцитозина и PARP-зависне ADP-рибозилације у процесу деметилације ДНК

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.