



ИНСТИТУТ INSTITUTE
ЗА МОЛЕКУЛАРНУ ГЕНЕТИКУ OF MOLECULAR GENETICS
И ГЕНЕТИЧКО ИНЖЕЊЕРСТВО AND GENETIC ENGINEERING
Универзитет у Београду University of Belgrade



Добре године за нове идеје • Good years for new ideas



Content

Садржај

Foreword	3	Уводна реч
History	5	Историја
Directors	9	Директори
Organization	10	Организација
Scientific and educational activities	12	Научно-наставна активност
Laboratories	14	Лабораторије
Staff development and publications	70	Развој научног кадра и радови
Development perspectives	72	Перспективе развоја
Collaboration	74	Сарадња
Sponsors	78	Спонзори



Уводна реч

Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (ИМГГИ – до 1988. године носио је назив Центар за генетичко инжењерство – ЦГИ) основан је 1986. године. Исте године, након што је Савезна скупштина тадашње Југославије усвојила Статут о ратификацији статута Међународног центра за генетичко инжењерство и биотехнологију (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology – ICGEB), Трст, Италија, ИМГГИ је постао придружени центар ICGEB и одмах је укључен у све активности ове међународне организације.

Почетно истраживачко језгро ИМГГИ формирали су истраживачи из Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института за нуклеарне науке „Винча“ и истраживачке јединице при Научноистраживачком институту „Галеника“. Изузетну улогу у формирању ИМГГИ имао је професор др Владимир Глишин, који је био иницијатор окупљања истраживача из наведених институција око молекуларне биологије као науке која је била основ за развој генетичког инжењерства. Подришку оснивању ИМГГИ, као суоснивач, дао је и тадашњи Одсек за биолошке науке Природно-математичког факултета Универзитета у Београду (данас Биолошки факултет). Основна научна стратегија у ИМГГИ била је да се формирају пројекти из различитих области молекуларне биологије и молекуларне генетике у којима ће истраживања бити базирана на коришћењу генетичког инжењерства, као најмодернијег приступа тог времена, што је случај и данас. Поред тога, циљ стратегије био је да се реализују усмерена истраживања, односно истраживања чији се резултати могу применити у биотехнолошким процесима. Ове пројекте финансирао је Министарство за науку и технолошки развој (данашње Министарство за просвету и науку), како кроз пројекте основних истраживања тако и преко иновационих и технолошких пројеката.

Foreword

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGI - The Centre for Genetic Engineering – CGI until 1988.) was established in 1986. That same year, after the former Yugoslav Federal Assembly adopted the Law on Ratification of the Statute of the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology - ICGEB) Trieste, Italy, IMGGI became affiliated centre of ICGEB and was immediately involved in all activities of this international organization.

The researchers from the Institute for Biological Research “S. Stanković”, Institute of Nuclear Sciences “Vinča” and Research Unit “Galenika” formed the IMGGI’s initial research core. An outstanding role in the formation of the Institute had professor Vladimir Glišin, who initiated gathering of the researchers from these institutions with focus on molecular biology as a basis for the development of genetic engineering. The establishment of IMGGI was supported by the Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Belgrade (Faculty of Biology) that was a co-founder of the Institute. Basic scientific strategy of IMGGI was the establishment of the projects in various fields of molecular biology and molecular genetics, where the research would be based on the use of genetic engineering as a cutting-edge approach at the time, as well as of today. In addition, the strategy aimed to implement targeted research or research whose results could be applied in different biotechnological processes. These projects were financed by the Ministry of Science and Technology (now Ministry of Education and Science), both through basic research projects and through innovative and technological projects.



Therefore, most of the scientific activities of IMGGE are focused on the research in molecular biology, molecular genetics, genetic engineering and biotechnology. In the field of fundamental research, projects of IMGGE are mainly focused on the research related to genome organization analyses and regulation of gene expression in different organisms. In addition, a portion of its activities IMGGE implemented in biotechnological and commercial applications in human and veterinary medicine, agriculture, food processing and pharmaceutical industries.

The establishment of research institution of such profile provided a platform for the improvement of educational quality, for both undergraduate (program Genetic Engineering and Biotechnology) and post-graduate studies (program Molecular Genetics and Genetic Engineering) at Faculty of Biology. In this way, IMGGE was already involved in training of personnel for the scientific research and technologies of the 21st century. IMGGE is a member of the University of Belgrade since 2004 and associates of IMGGE participate in the work of the University Senate, the Council of Institutes, Academic Council of Natural and Mathematical Sciences and Professional Ethics Committee, thus participates actively in defining and conducting educational and scientific policy of the University of Belgrade.

IMGGE collaborates with a large number of medical institutions in Serbia. In addition, the research groups of IMGGE are members of various international organizations: "European Plant Science Organization" (EPSO) in which IMGGE is a representatives for the Republic of Serbia since 2003 and IMGGE is also involved in testing ("Proficiency testing") at "International Seed Testing Association" (ISTA) from 2002. IMGGE's associate is a coordinator for the Republic of Serbia of "The portal for rare diseases and orphan drugs" (ORPHANET) since 2005 and of "The European Association for Predictive, Preventive & Personalized Medicine" organization (EPMA) since 2008. Starting from 1996, laboratories from IMGGE participate in several European external quality control systems (ISTA, DGKL and CF Network / EuroGentest). An associate of IMGGE is also a coordinator of "The Serbian National Mutation Frequency Database". (www.goldenhelix.org).

Institute's openness to other scientific institutions provided constant exchange of knowledge, as well as staff training in the field of molecular biology and molecular genetics. A scientific policy of IMGGE provided realization of a large number of foreign projects and this strategy resulted in high credibility of the Institute. Moreover, a large number of former associates of the Institute are now the leading researchers in international laboratories.

Ljubiša Topisirović, Director of IMGGE

Стога је већина научне активности ИМГГИ и усмерена ка основним истраживањима у молекуларној биологији, молекуларној генетици, генетичком инжењерству и биотехнологији. У области основних истраживања, пројекти ИМГГИ су највећим делом фокусирани на истраживања везана за анализу организације генома и регулације генске експресије у разним организмима. Поред тога, један део својих активности ИМГГИ реализује кроз биотехнолошке и комерцијалне аспекте у хуманој и ветеринарској медицини, пољопривреди, производњи хране и фармацеутској индустрији.

Оснивање истраживачке институције оваквог профила обезбедило је платформу за унапређење квалитета наставне базе како за додипломску (усмерење Генетичко инжењерство и биотехнологија) тако и за последипломску наставу у области молекуларне биологије (смер Молекуларна генетика и генетичко инжењерство) на Биолошком факултету. Најједноставније речено, већ тада је ИМГГИ учествовао у обезбеђивању услова за школовање кадра за научна истраживања и технологије 21. века. ИМГГИ је члан Универзитета у Београду од 2004. године, те сарадници ИМГГИ учествују у раду Сената, Већа института, Већа научних области природних наука, као и Одбора за професионалну етику и на тај начин активно се укључио у дефинисање и вођење наставно-научне политике Универзитета у Београду.

ИМГГИ остварује сарадњу са великим бројем медицинских институција у Србији. Поред тога, истраживачке групе ИМГГИ чланице су разних међународних организација - "European Plant Science Organization" (EPSO), у којој је ИМГГИ представник Србије од 2003. године, а од 2002. године укључен је и у тестирање ("Proficiency testing") при "International Seed Testing Association" (ISTA). Сарадник ИМГГИ је координатор за Србију "The portal for rare diseases and orphan drugs" (ORPHANET) од 2005. године и организације "The European Association for Predictive, Preventive & Personalised Medicine" (EPMA) од 2008. године. Лабораторије ИМГГИ, почев од 1996. године, учествују у неколико европских екстерних система контроле квалитета (ISTA, DGKL и CF Network/ EuroGentest). Сарадник ИМГГИ је такође координатор "The Serbian National Mutation Frequency database" (www.goldenhelix.org).

Отвореност ИМГГИ према осталим научним институцијама у земљи и иностранству омогућила је да се врши стална размена знања, као и обука кадрова у молекуларној биологији и молекуларној генетици. У ИМГГИ се увек инсистирало да сарадници конкуришу за добијање иностраних пројеката, те је у протеклих 25 година велики број таквих пројеката реализован у овом институту. Као резултат овакве политике остварен је висок кредибилитет ИМГГИ. Велики број бивших сарадника ИМГГИ данас су водећи истраживачи у светским лабораторијама.

Љубиша Тописировић, директор ИМГГИ

Историјат

1972. Одсек за биолошке науке Природно-математичког факултета (данашњи Биолошки факултет) Универзитета у Београду 1972. године формира студијску групу Молекуларна биологија и физиологија и тако прати савремене трендове образовања у биологији. Захваљујући формирању ове студијске групе, основна истраживања у биологији у нашој средини од 80-их година прошлог века све више почињу да користе као „алат” генетичко инжењерство с циљем изучавања структуре и функције гена разних организама, односно почиње ера манипулације генима.

1982. Почетком осамдесетих година прошлог века, београдске групе истраживача из Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” (ИБИСС), Института за нуклеарне науке „Винча” и Лабораторије за генетичко инжењерство при Институту „Галеника” започињу пионирске експерименте клонирања гена на домаћој сцени. Године 1983. група из ИБИСС клонира је у *Escherichia coli* бактеријски ген за пеницилин амидазу, а потом је клониран и ген за β -интерферон човека. У Лабораторији за генетичко инжењерство Института „Галеника” је, први пут у свету, одређена парцијална секвенца ДНК α - и β -глобинских гена пацова.

1986. Захваљујући спремности београдских истраживача који су били школовани у Београду као и ван наше земље, да се ухвате у коштац са савременим техникама молекуларне биологије и молекуларне генетике, а уз подршку научних и привредних институција, као и дела политичке структуре која је имала слуха да помогне, 1986. године основан је Центар за генетичко инжењерство (касније преименован у Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство – ИМГГИ). На почетку се Центар налазио у „сендвичу” између Школе за негу лепоте и Више електротехничке школе, на трећем спрату зграде у улици Војводе Степе 283. Први директор, уједно и идејни творац и утемељивач ИМГГИ, био је професор др Владимир Глишин.

У новооснованом Центару за генетичко инжењерство у тиму искусних истраживача, уз проф. др Владимира Глишину, лабораторијама и пројектима руководили су: проф. др Ана Савић, проф. др Драгутин Савић, проф. др Радомир Црквењаков и проф. др Љубиша Тописировић.

1988. Први докторат, произашао искључиво из рада у једној од лабораторија ИМГГИ, одбранио је др Радоје Дрманач. Овај пионирски рад везан је за оригиналну идеју секвенцирања ДНК хибридизацијом (SBH метода) и група сарадника ове лабораторије, предвођена руководиоцем проф. др Радомиром Црквењаковим, одлази у Argonne National Laboratory (Argonne, Illinois, САД) где формирају компанију за секвенцирање геномске ДНК.



Проф. Владимир Глишин
Vladimir Glišin, Professor

A Brief History

1972. At the Faculty of sciences, Department of Biology (currently Faculty of Biology), University of Belgrade, the Study group for Molecular Biology and Physiology was established with the aim to follow current trends of education in biology. Genetic engineering techniques as a "tool" for studying the structure and function of genes in various organisms have been introduced in the fundamental research in biology, i.e. a period of gene manipulation commenced.

1982. In the beginning of eighties, a group of Belgrade's researchers from the Institute for Biological Research "Siniša Stanković", the Institute for Nuclear Sciences "Vinča" and Laboratory for Genetic Engineering of "Galenika" Institute, was the first one in the country to perform pioneering experiments of genes cloning. In 1983 a research group from the Institute for Biological Research "Siniša Stanković" cloned penicillin amidase gene from *Escherichia coli*. Shortly after, researchers from the Laboratory for Genetic Engineering ("Galenika" Institute) cloned human gene for β -interferon in *E. coli*, and at the same time, a partial sequences of rat α - and β -globin genes had been revealed for the first time.

1986. Thanks to a critical mass of Belgrade's researchers that were educated and trained in Belgrade as well as abroad, it was possible to clinch with existing techniques of molecular biology and molecular genetics. With the support of scientific, economic and political institutions, the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE - formerly Centre for Genetic Engineering) was founded and Professor Vladimir Glišin, the creator and founder of IMGGE, was established as a first director.

Together with Prof. Vladimir Glišin, heads of newly created laboratories were: Prof. Ana Savić, Prof. Dragutin Savić, Prof. Radomir Crkvenjakov and Prof. Ljubiša Topisirović.

1988. The PhD thesis defended by Radoje Drmanac, was the very first one derived solely from the work in IMGGE. This was a pioneering work related to the development of SBH technology (sequencing by hybridization) and a group of associates from this laboratory, led by Prof. Radomir Crkvenjakov went to Argonne National Laboratory (Argonne, Illinois, USA) where a company for the sequencing of genomic DNA was established.



Др Радоје Дрманач
Radoje Drmanac, PhD



Проф. Ана Савић
Ana Savić, Professor



Проф. Драгутин Савић
Dragutin Savić, Professor



Проф. Радомир Црквењаков
Radomir Crkvenjakov, Professor



Проф. Љубиша Тописировић
Ljubiša Topisirović, Professor

25
година • years

1998. In the early nineties, constructions of the new building has begun and finally, in 1998 the IMGGE's researchers were ready to move in.

Since the establishment of the Institute, from the initial five laboratories, due to branching of research scope, several laboratories were formed.

Laboratory for Molecular Hematology (LAB01)

Heads: Zvezdana Popović, PhD (1996–99), Jelena Zarić, PhD (1999–2000), Sonja Pavlović, PhD (2001–)

- For the first time in Serbia, molecular basis of thalassemia, phenylketonuria, inflammatory bowel diseases and majority of hematological malignancies were studied.
- Pioneer research in pharmacogenomics drew attention to a novel pharmacogenomic marker.
- Knowledge acquired through the fundamental research has been applied in diagnostic and therapeutic protocols in Serbia and region.

Laboratory for Genetic Engineerin of Microorganisms (LAB02)

Head: Miroslav Konstantinović, PhD (1996–2000)

- For the first time in ex SFR Yugoslavia, a human gene (gene for β -interferon) was expressed in *E. coli* under the control of strong promoter constructed in IMGGE.
- A sequence of penicillin amidase (*pac*) gene from *Arthrobacter viscosus* was published.
- The shortest fragment of *E. coli pac* promoter gene that is positively regulated by phenylacetic acid and CRP protein was defined and a global regulator - IHF (integration host factor) was found to positively regulate expression of *pac* gene.

Laboratory for Molecular Biology (LAB03)

Heads: Ana Savić, Professor (1986–2002), Dragana Stefanović, PhD (2002–2005), Snežana Kojić, PhD (2005–2010), Dragica Radojković, PhD (2010–)

- Research based on DNA structure led to the first data regarding CFTR mutation type and frequency in Serbian population. These data were included in European studies setting a foundation for long lasting collaboration trough CF Network and several international projects and databases.



1998. Почетком деведесetих назирале су се контуре нове зграде у коју је ИМГГИ требало да се пресели. Коначно, средином 1998. године нова зграда била је спремна за усељење и ИМГГИ је смештен у шест пута већи простор у односу на онај из 1986. године.

Од оснивања ИМГГИ, од почетних пет лабораторија, а гранањем проблематика и проширивањем спектра модел-система истраживања, формирано је још неколико лабораторија.

Лабораторија за молекуларну хематологију (ЛАБ01)

Руководиоци: др Звездана Поповић (1996–1999), др Јелена Зарић (1999–2000), др Соња Павловић (2001– даље)

- Први пут у Србији су изучаване молекуларне основе таласемије, фенилкетонурије, запаљењских болести црева и већине хематолошких малигнитета.
- Пионирска истраживања из области фармакогеномике промовисала су нови фармакогеномички маркер.
- Сазнања стечена у основним истраживањима већ су у примени у дијагностичким и терапијским протоколима у Србији и шире.

Лабораторија за генетичко инжењерство микроорганизама (ЛАБ02)

Руководилац: др Мирослав Константиновић (1996–2000).

- Први пут у СФР Југославији у *E. coli* је експримиран хумани ген, ген за β -интерферон, а за експресију коришћен је „домаћи”, тј. конструисан јак промотор.
- Први пут у свету објављена је секвенца за пеницилин амидазу из бактерије *Arthrobacter viscosus*.
- Дефинисан је минималан регион промотора гена за пеницилин амидазу, неопходан за позитивну контролу регулације транскрипције фенил-сирћетном киселином и CRP протеином (catabolite regulation protein).
- Откривено је да глобални регулатор – IHF (integration host factor) контролише активацију *pac* гена.

Лабораторија за молекуларну биологију (ЛАБ03)

Руководиоци: проф. др Ана Савић (1986–2002), др Драгана Стефановић (2002–2005), др Снежана Којић (2005–2010), др Драгица Радојковић (2010–даље)

- Истраживања проистекла из структурне анализе ДНК дала су прве податке о типовима и заступљености мутација у *CFTR* гену у нашој популацији који су укључени и у европске студије, чиме је постављена основа за дугогодишњу сарадњу у оквиру CF



Network и учествовање у неколико међународних пројеката и база података.

- Прва лабораторија у Србији која је стандардизовала и увела методе молекуларне дијагностике цистичне фиброзе, хемофилије и тромбофилије.

Лабораторија за хуману молекуларну генетику (ЛАБ04)

Руководилац: др Милена Стевановић (1994–даље)

- Клонирани су и по први окарактерисани нови чланови фамилије SOX гена код човека (хумани SOX14, SOX18 и SOX20 гени).
- Урађена је прва карактеризација промотора и структурна анализа регулаторних региона одабраних хуманих SOX гена.
- Идентификовани су бројни општи и ткивно специфични транскрипциони фактори, као и сигнални путеви који учествују у транскрипционој регулацији експресије одабраних хуманих SOX гена.
- Прва Лабораторија у Србији која је увела и применила методу флуоресцентне *in situ* хибридизације (FISH) у дијагностици нумеричких и структурних реаранжмана хромозома код човека.
- Прва примена молекуларне дијагностике адхезионе дефицијенције леукоцита говеда (BLAD) и стресног синдрома свиња у Србији.
- Развој метода за одређивање генетичких варијанти и селекцију пожељних варијанти κ -казеина и β -лактоглобулина које утичу на прерађивачке особине млека код говеда.

Лабораторија за молекуларну генетику и екологију микроорганизама (ранији назив Лабораторија за молекуларну генетику актиномицета) (ЛАБ05)

Руководилац: др Бранка Васиљевић (1998–даље)

- Клониран је и окарактерисан ген (*sgm*) одговоран за резистенцију на аминогликозидне антибиотике из произвођача антибиотика *Micromonospora zionensis*.
- Претраживање узорака земље с циљем да се изолују бактеријски сојеви који производе имуносупресоре са сличним механизмом деловања као FK506 довело је до изолације новог соја актиномицета *Streptomyces durmitorensis* sp. nov. MS405T.
- Четири нове Грам-позитивне бактерије способне да разграђују ксенобиотике изоловане су из ризосфера ендемореликтних биљака *Ramonda serbica* и *Ramonda nathaliae*.

- Laboratory was a pioneer in the field of human molecular genetics in Serbia, through standardisation and introduction of genetic testing for cystic fibrosis, hemophilia and thrombophilia.

Laboratory for Human Molecular Genetics (LAB04)

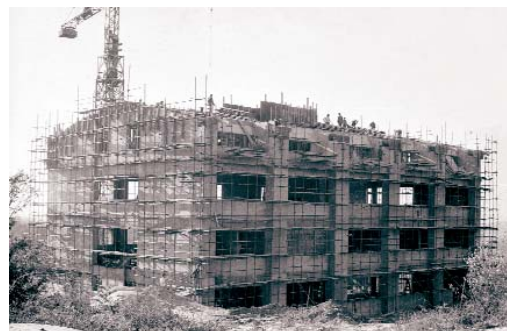
Head: Milena Stevanović, PhD (1994–)

- Cloning and the first characterization of the novel human SOX gene family members (human SOX14, SOX18 and SOX20 genes).
- First promoter characterization and structural analysis of the regulatory regions from selected human SOX genes.
- Identification of numerous general and tissue specific transcription factors, as well as, signaling pathways involved in the transcriptional regulation of selected human SOX genes expression.
- First Laboratory in Serbia that developed and applied fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for diagnostics of structural and numerical chromosome aberrations in humans.
- First application of molecular diagnostics of BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) and porcine stress syndrome in Serbia.
- Development of methods for genotyping of κ -casein and β -lactoglobulin and selection of desirable variants that have an effect on milk production traits in cattle.

Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology (former Laboratory for Molecular Genetics of Actinomycetes) (LAB05)

Head: Branka Vasiljević, PhD (1998–)

- Aminoglycoside resistance gene (*sgm*) from *Micromonospora zionensis*, a producer of antibiotics, was cloned and characterized.
- Screening of soil samples for strains producing immunosuppressants with a similar mechanism of action to FK506, resulted in the isolation of the novel actinomycete strain *Streptomyces durmitorensis* sp. nov. MS405T.
- Four new Gram positive bacteria with the ability of xenobiotic degradation were isolated rhizospheres of endemorelict plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*.





Laboratory for Molecular Genetics of Industrial Microorganisms (LAB06)

Heads: Ljubiša Topisirović, professor (1986–2010), Milan Kojić, PhD (2011–)

- A collection of lactic acid bacteria from autochthonous dairy products, as well as human, intestinal, oral and vaginal lactobacilli was established.
- Genetically characterized bacteria from the collection were used for the construction of starter cultures for production of semi-hard cheeses of Trapist type in dairy in Serbia ("MLEKOPRODUKT", Zrenjanin) and probiotic beverage of yogurt type (dairy "AMALTHEA", Bač).
- Development of probiotic preparations for human use (cooperation with pharmaceutical company "Galenika").
- Complete genome of a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SJ2-8 from Sjenički cheese was sequenced.

Laboratory for Molecular Biotechnology (LAB07)

Head: Goran Ljubijankić, PhD (1996–2003)

- Penicillin G amidase from *Providencia rettgeri* was cloned and overexpressed in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its glycosylated thermostable form was produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.
- A covalent immobilization of obtained penicillin G acylase was accomplished.
- Synthesis and secretion of biologically active recombinant human interferon- β 1 (rHuIFN- β 1) was achieved in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.
- *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 was constructed and proved to be useful in detection of immunosuppressants produced by soil actinomycetes.

Laboratory for Plant Molecular Biology (LAB08)

Head: Vesna Maksimović, PhD (2002–)

- *FeLEG1* (AY359286) was the first genomic clone for storage proteins isolated from buckwheat, as well as the only one among the methionine-rich legumin group. Besides, *FeAP9* (AM422870) and *FeAPL1* (DQ241824) were also the first buckwheat genomic clones coding for typical and atypical aspartic proteinases, respectively.
- First laboratory in Serbia that developed and standardized the PCR method for the detection and identification of genetic modification in plant material and food/feed products. The IMGGE was authorized by Ministry of Agriculture of Republic of Serbia as an official institution for GMO testing and performing these services for border inspection.
- The laboratory is involved in International Quality Control system organized by International Seed Testing Association ("ISTA proficiency testing").

Лабораторија за молекуларну генетику индустријских микроорганизама (ЛАБ06)

Руководиоци: проф. др Љубиша Тописировић (1986–2010), др Милан Којић (2011–даље)

- Формирана је колекција изолата бактерија млечне киселине из аутохтоних млечних производа, као и хуманих, интестиналних, оралних и вагиналних лактобацила.
- Генетички окарактерисане бактерије из колекције искоришћене су за конструкцију стартер култура за производњу полутврдог сира типа „трапист“ (сарадња са млекарском „МЛЕКОПРОДУКТ“, Зрењанин) и за производњу пробиотичких напитака типа јогурта (сарадња са млекарском „АМАЛТНЕА“, Бач).
- Развој пробиотичких препарата за људску употребу (сарадња са фармацеутском индустријом „ГАЛЕНИКА“, Београд).
- Секвенциран је комплетан геном потенцијалног пробиотичког соја *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SJ2-8 изолованог из сјеничког сира.

Лабораторија за молекуларну биотехнологију (ЛАБ07)

Руководилац: др Горан Љубијанкић (1996–2003)

- Ген за пеницилин G амидазу соја *Providencia rettgeri* клониран је и "over" експримиран у пекарском квасцу *Saccharomyces cerevisiae*, а гликозилована и термостабилна форма ензима произведена је у метилотрофном квасцу *Pichia pastoris*.
- Постигнута је ковалентна имобилизација добијене пеницилин G амидазе.
- Синтеза и секреција биолошки активног рекомбинованог хуманог интерферона β 1 (rHuIFN- β 1) је постигнута у сојевима квасца *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.
- Конструисан је сој *Saccharomyces cerevisiae* FAV20 за детекцију имуносупресора које производе земљишне актиномицете.

Лабораторија за молекуларну биологију биљака (ЛАБ08)

Руководилац: др Весна Максимовић (2002–даље)

- Клониран *FeLEG1* (AY359286) – први објављени геномски клон за резервне протеине хељде као и једини који припада групи метионином богатих резервних протеина легуминоског типа. Поред овог гена, први пут објављени су и гени за типичну - *FeAP9* (AM422870) и атипичну- *FeAPL1* (DQ241824) аспартичну протеиназу хељде.
- Први пут у Србији развијена је и стандардизована метода за детекцију и идентификацију генетичких модификација у биљном материјалу и храни биљног порекла. На основу тога, ИМГТИ је овлашћен од Министарства пољопривреде Републике Србије да обавља ове услуге за потребе граничних инспекција.
- Лабораторија је укључена у европски систем "ISTA proficiency testing".



Директори ИМГГИ

1. Проф. др Владимир Глишин, оснивач и први директор ИМГГИ 1986–1988, 1990–1995
2. Проф. др Љубиша Тописировић, 1988–1989, 2011–
3. Др Звездана Поповић, 1989–1990, 1996–1999
6. Др Бранка Васиљевић, 1999–2010



Проф. Владимир Глишин
Vladimir Glišin, Professor



Др Звездана Поповић
Zvezdana Popović, PhD

Directors of IMGGE

1. Vladimir Glišin, Professor, 1986–1988, 1990–1995
2. Ljubiša Topisirović, Professor, 1988–1989, 2011–
3. Zvezdana Popović, PhD, 1989–1990, 1996–1999
4. Branka Vasiljević, PhD, 1999–2010



Проф. Љубиша Тописировић
Ljubiša Topisirović, Professor



Др Бранка Васиљевић
Branka Vasiljević, PhD

25
година • years



Board

Miodrag Stojković, Professor, President Of The Board
Mirjana Branković Magić, PhD
Sabera Ruždijić, PhD
Anđela Vukota, PhD
Dragica Radojković, PhD
Milan Kojić, PhD
Gordana Nikčević, PhD

Scientific Council

Ljubiša Topisirović, Professor
Vesna Maksimović, Principal Research Fellow
Miroslav Konstantinović, Principal Research Fellow
Branka Vasiljević, Principal Research Fellow
Milan Kojić, Principal Research Fellow
Milena Stevanović, Principal Research Fellow
Dragica Radojković, Principal Research Fellow
Sonja Pavlović, Senior Research Associate
Ivana Strahinić, Senior Research Associate
Nataša Golić, Senior Research Associate
Gordana Nikčević, Senior Research Associate
Jelena Begović, Research Associate
Jelena Samardžić, Research Associate
Ivana Morić, Research Associate
Jelena Kušić, Research Associate
Branka Zukić, Research Associate
Marija Mojsin, Research Associate
Nataša Kovačević Grujičić, Research Associate

Board

Director

Scientific Council

Laboratories

Laboratory for Molecular Hematology

Sonja Pavlović, Senior Research Assistant

Laboratory for Molecular Biology

Dragica Radojković, Principal Research Fellow

Laboratory for Human Molecular Genetics

Milena Stevanović, Principal Research Fellow

Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology

Branka Vasiljević, Principal Research Fellow

Laboratory for Molecular Genetics of Industrial Microorganisms

Milan Kojić, Principal Research Fellow

Laboratory for Plant Molecular Biology

Vesna Maksimović, Principal Research Fellow

Frame encompasses laboratories forming Sector for Laboratory Examinations

Administration, Service & Support Units

Legal – Violeta Evtov, LLB

Personnel – Milica Pecold

Finance & Accounting Unit – Duško Vujić, Maja Jevtić

Technical Service – Mladen Čujić



Управни одбор

Проф. Миодраг Стојковић, председник Управног одбора
 Др Мирјана Бранковић Магић
 Др Сабера Руждијић
 Др Анђела Вукота
 Др Драгица Радојковић
 Др Милан Којић
 Др Гордана Никчевић

Чланови Научног већа су:

Проф. Љубиша Тописировић, научни саветник, редовни професор
 Др Весна Максимовић, научни саветник
 Др Мирослав Константиновић, научни саветник
 Др Бранка Васиљевић, научни саветник
 Др Милан Којић, научни саветник
 Др Милена Стевановић, научни саветник
 Др Драгица Радојковић, научни саветник
 Др Соња Павловић, виши научни сарадник
 Др Ивана Страхинић, виши научни сарадник
 Др Наташа Голић, виши научни сарадник
 Др Гордана Никчевић, виши научни сарадник
 Др Јелена Беговић, научни сарадник
 Др Јелена Самарџић, научни сарадник
 Др Ивана Морић, научни сарадник
 Др Јелена Кушић, научни сарадник
 Др Бранка Зукић, научни сарадник
 Др Марија Мојсин, научни сарадник
 Др Наташа Ковачевић Грујичић, научни сарадник

Управни одбор

Директор

Научно веће

Лабораторије

Лабораторија за молекуларну хематологију
 Соња Павловић, виши научни сарадник
 Лабораторија за молекуларну биологију
 Драгица Радојковић, научни саветник
 Лабораторија за хуману молекуларну генетику
 Милена Стевановић, научни саветник
 Лабораторија за молекуларну генетику и екологију
 микроорганизама
 Бранка Васиљевић, научни саветник
 Лабораторија за молекуларну генетику индустријских
 микроорганизама
 Милан Којић, научни саветник
 Лабораторија за молекуларну биологију биљака
 Весна Максимовић, научни саветник

Уоквирене лабораторије чине Сектор за лабораторијска испитивања

Администрација и помоћне службе

Секретар – Виолета Евтов, дипл. правник
 Кадровска служба – Милица Пеџолд
 Финасије – Душко Вујић, Маја Јевтић
 Техничка служба – Младен Ђујић

Scientific and Educational Activities

From its establishment in 1986, IMGGE has qualified as an affiliate center of the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB). Former Yugoslavia was one of the conceptual and actual founders of ICGEB. Under the patronage of United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), the First Ministerial Conference on the establishment of ICGEB was held in December 1982, in Belgrade. In 1983, professor Vladimir Glišin was a member of the international experts team, which aim was to evaluate and rank the candidate countries - three from Europe, one from Latin America, and three from Asia. At the final meeting held in Madrid, Spain, the proposal of Italy was accepted and the most successful candidate, Trieste was chosen to become a headquarter of ICGEB. Today, ICGEB encompasses 80 full member countries. Professor Glišin was a member of Council of Scientific Advisers (CSA) which is an advisory body of ICGEB, for nine years. Each member state is represented in the Board of Governors with their state representative. Since it has been founded in 1986, IMGGE is involved in nomination of Governor, representative of our country, who together with Lesion Officer (usually the Director of Affiliated Centre, i.e. IMGGE) participates in the activities of the Board of Governors. Beside all the activities in the Board of Governor, IMGGE, at the national level, endorses proposed projects and applications for short and long term scholarships for training and research in ICGEB centres. Up to date, more than 140 researchers from Serbia have received training at ICGEB centres, 16 Collaborative Research Projects have been funded and as a part of ICGEB practical and theoretical courses, a course titled "Molecular Diagnostics of Human Diseases" has been held at IMGGE in 2005. Until now it has been allocated more than 2.500.000 US dollars to our country for all educational and scientific activities.

IMGGE has 25 years long tradition of engagement in teaching at the Faculty of Biology University of Belgrade. Together with the Faculty of Biology and Institute for Biological Research "Siniša Stanković", IMGGE is involved in carrying out doctoral studies, programme "Molecular Biology". IMGGE has also signed a collaboration agreement for doctoral studies with the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade. Moreover, associates of the Department of Biochemistry and Molecular Biology at the Faculty of Biology, University of Belgrade perform their research and are involved in scientific projects of IMGGE.

Alongside with the Faculty of Biology, IMGGE has developed collaboration with the School of Medicine, the Faculty of Technology and Metallurgy, the Faculty of Agriculture, the Faculty of Pharmacy and the Faculty of Dental Medicine within University of Belgrade, the Faculty of Medicine and the Faculty of Technology in Leskovac within University of Niš, where several MSc and PhD theses, that have been completed at IMGGE, were defended. Also, IMGGE associates were involved in postgraduate studies organized by the Military Medical Academy, Belgrade and Medical Centre "Bežanijska kosa", Belgrade.

The best testimony of IMGGE's success and collaboration with numerous academic and research institutions is a significant number of completed diploma thesis (near 168), master degrees (88) and PhD thesis (56).



Научно-наставна активност

ИМГГИ се од самог оснивања Међународног центра за гентичко инжењерство и биотехнологију (International Center for Genetic Engineering and Biotechnology - ICGEB) 1986. године квалификовао као њен Придружени центар. Ондашња Југославија је била један од идејних и физичких оснивача ICGEB. Тако је прва министарска конференција о оснивању ICGEB под патронатом United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) одржана у Београду, децембра 1982. године. Професор Владимир Глишин је 1983. године био члан међународног експертског тиме за вредновање и рангирање кандидата држава, а било их је три из Европе, једна из Јужне Америке, три из Азије. На крају, за седиште на завршном министарском састанку одржаном у Мадриду, Шпанија, прихваћен је предлог Италије, те је као најуспешнији кандидат, Трст изабран за њено седиште. Данас ICGEB има 80 пуноправних држава чланица. У саставу ICGEB као саветодавно тело функционише и Council of Scientific Advisers (CSA) чији је члан девет година био и проф. Глишин. Свака држава чланица је у Савету гувернера заступљена са својим државним представником. ИМГГИ од 1986. године, дакле од самог њеног оснивања предлаже именовање гувернера, који заједно са официром за везу (по правилу, директор ИМГГИ) учествује у раду највишег органа ICGEB – Савету гувернера. Поред тога, ИМГГИ организује на нивоу Србије селекцију предложених пројеката и пријава за краткорочне и дугорочне студијске боравке у ICGEB центрима. До сада је више од 140 истраживача из Србије било на таквим усавршавањима, финансирано је 16 колаборативних пројеката и у оквиру програма практичних и теоријских курсева ICGEB, у ИМГГИ је 2005. године организован и курс „Молекуларна дијагностика хуманих болести“. За све ове активности, нашој научно-истраживачкој заједници је до сада ICGEB одобрио више од 2.500.000 УСД.

Сарадници ИМГГИ већ годинама учествују у извођењу наставе на Биолошком факултету Универзитета у Београду, са којим је ИМГГИ потписао уговор о сарадњи. У сарадњи са Биолошким факултетом и Институтом за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, ИМГГИ реализује докторске студије у оквиру студијског програма „Молекуларна биологија“. Уговор о сарадњи на докторским студијама ИМГГИ је потписао и са Фармацеутским факултетом Универзитета у Београду. С друге стране, сарадници Катедре за биохемију и молекуларну биологију Биолошког факултета Универзитета у Београду реализују своја истраживања кроз пројекте у ИМГГИ.

Поред Биолошког факултета, ИМГГИ је до сада имао научно-истраживачку сарадњу са Медицинским, Технолошко-металуршким, Пољопривредним, Фармацеутским и Стоматолошким факултетом Универзитета у Београду, Медицинским факултетом Универзитета у Нишу и Технолошким факултетом у Лесковцу Универзитета у Нишу, на којима је било одбрањено неколико магистарских и докторских теза чији су експериментални делови урађени у ИМГГИ. Поред тога, сарадници ИМГГИ били су укључени и у последипломску наставу коју су организовали Војномедицинска академија у Београду и Клиничко-болнички центар „Бежанијска коса“, Београд.



О успешности сарадње ИМГГИ са академским и истраживачким институцијама сведочи и број до сада урађених дипломских радова (168), магистарских теза (88) и докторских дисертација (56).

ИМГГИ је 2003. године основао Фондацију „Горан Љубијанкић”, после трагичне смрти др Горана Љубијанкића, чији је циљ да помогне младим и перспективним научницима из наше земље који се баве истраживањима у области молекуларне биологије. Оснивање Фондације, поред родитеља др Љубијанкића и ИМГГИ, помогле су и колеге из ICGEB. Фондација сваке године додељује награде најуспешнијим младим истраживачима за постигнуте резултате из области молекуларне биологије.

Молекуларна биологија је, поред информационих технологија, најатрактивнија наука нашег доба. Стога је неопходно надахнути младе људе да се одреде да своју енергију усмере на истраживања у науци будућности. Због сензационалних открића која се у овој науци догађају скоро свакодневно, општа популација, па чак и стручна јавност често не могу да схвате значај тих открића, нити да избегну осећања забринутости и страха проузрокована непознавањем основа ове науке. Због тога је у ИМГГИ формиран тим за популаризацију науке, који континуирано ради на промоцији молекуларне биологије у Србији.

ИМГГИ је успешно реализовао пројекат „Мала школа ДНКлогије“ у 2009. и 2010. години, који је финансирало Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије. Програм „Мала школа ДНКлогије“ реализован је кроз два вида активности: Радионица и Путујућа лабораторија. Активностима је било обухваћено неколико хиљада основаца, средњошколаца и деце у предшколским установама и установама за незбринуту децу. Такође су садржаји програма били доступни општој популацији у музејима, на улици (Змајеве дечје игре, Нови Сад) и у Француском културном центру, где је „Мала школа ДНКлогије“ једина обележила европску „Ноћ истраживача“ у Београду. Програм „Мала школа ДНКлогије“ је у протеклом пројектном периоду, поред у Београду, био реализован и у Инђији, Новом Саду, Зрењанину, Младеновцу и Церовцу. ИМГГИ је запажен учесник Фестивала науке 2008, 2009. и 2010. године. У сарадњи са Центром за популаризацију науке и уметности ИМГГИ ће организовати „Ноћ истраживача“ у септембру 2011. у Београду у оквиру пројекта „Грозница ноћи истраживача“ који финансира Европска комисија у склопу оквирног програма 7 (ОП7).



Др Горан Љубијанкић
Goran Ljubijankić, PhD
(1961–2002)

IMGGE has established “Goran Ljubijankić” Foundation in 2003, after the tragic death of Goran Ljubijankić, PhD, which gives support to young and promising scientists who are engaged in research in the field of molecular biology in our country. Colleagues from ICGEB supported the establishment of the Foundation, in addition to Goran’s parents and IMGGE. Foundation “Goran Ljubijankić” each year rewards the most successful young researchers for their achievements in the field of molecular biology.

Molecular biology, besides information and communication technologies, is the most attractive science of our time. Therefore, it is necessary to motivate young people to direct their energy towards research within this exciting field of science. Sensational discoveries happen almost every day in this field of science. However, general public, and even experts often have difficulties in understanding of real meaning of these findings, barely avoiding worry and fear. That is why a team of experienced researchers responsible for popularization of science has been assembled at IMGGE and their mission is to continuously promote molecular biology in Serbia.

IMGGE has effectively realized project “Short Course of DNAology” in 2009 and 2010, which was supported by Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia. This project has been realized through two types of activities: Travel-



ling Lab and Workshops. The program reached several thousands of children in both elementary and high schools, as well as children in kindergartens and orphanages. Moreover, the program was available to general public in museums, streets (Zmaj’s Children Games, Novi Sad) and in the Cultural centre of France, where the “Short course of DNAology” was the sole happening that marked “Researcher’s Night” in Belgrade. Beside Belgrade, in the last project period, the “Short course of DNAology” program was realized in Indjija, Novi Sad, Zrenjanin, Mladenovac, Cerovac, etc. IMGGE was a successful participant of the Science Festival in Belgrade from 2008 to 2010. In September 2011, IMGGE in collaboration with the Centre of Sciences and Art Promotion, will organize “Researchers’ Night” in Belgrade. The project “Researcher’s Night Fever” is supported by European Commission as a part of FP7 program.



25
ГОДИНА - УСПЕХ

Лабораторија за молекуларну хематологију
Laboratory for Molecular Hematology



Laboratory for Molecular Hematology

Head: Sonja Pavlović, PhD, Senior research associate

Research team:

Gordana Nikčević, PhD
Maja Stojiljković Petrović, PhD
Branka Zukić, PhD
Nataša Tošić, PhD
Tatjana Kostić, PhD
Teodora Karan Đurašević, BSc
Vesna Spasovski, BSc
Milena Radmilović, BSc
Biljana Stanković, BSc
Nikola Kotur, BSc
Kristel Klaassen, BSc
Sanja Srzentić, BSc

Лабораторија за молекуларну хематологију

Руководилац: др Соња Павловић, виши научни сарадник

Истраживачки тим:

др Гордана Никчевић
др Маја Стојиљковић Петровић
др Бранка Зукић
др Наташа Тошић
др Татјана Костић
Теодора Каран Ђурашевић
Весна Спасовски
Милена Радмиловић
Биљана Станковић
Никола Котур
Kristel Klaassen
Сања Срзентић

Abstract

Initial research performed in Laboratory for Molecular Hematology (LMH) was devoted to studying transcription regulation of eukaryotic genes in Belgrade anemic rat. Keeping up the pace with the world science, research was performed in the field of gene therapy. In the 21st century, LMH turns to the most current field of research – biomedicine. For the first time in Serbia, molecular basis of thalassemia and hematological malignancies (childhood and adult acute and chronic leukemias) was studied. Research interest of LMH for human molecular pathology was broadened with the studies of phenylketonuria and inflammatory bowel diseases. LMH also started the first research in the field of pharmacogenomics in Serbia. Alongside with the research work, LMH is recognizable in Serbia and beyond for diverse range of modern molecular genetic diagnostic methods introduced for the first time in LMH. Also, LMH is exceptionally active in the field of popularization and promotion of science.

Research focus

Initial research performed in Laboratory for Molecular Hematology (LMH) was devoted to studying molecular basis of anemias. Using a model system for hereditary microcytic, hypochromic anemia (b/b rat), research was focused on regulation of globin genes expression, as well as erythropoietic cell membrane protein coding genes. The aim of this study was to correlate obtained results with human anemias. Studies of proteins involved in pathological phenotype were broadened to chronic granulomatous disease.

Simultaneously, for the first time in our country, research in the field of gene therapy was started. Defective retroviral vectors were constructed and their efficacy in mammalian cells in culture was tested. Mechanisms of regulation of human recombinant β -interferon gene expression were studied, and for the first time, constitutive expression of this gene from retroviral vector was obtained.

In the beginning of the 1990s research in LMH was dedicated to studying of hematopoietic stem cells, and work on gene therapy was continued. Human, mouse and rat permanent hematopoietic cell lines were success-

Апстракт

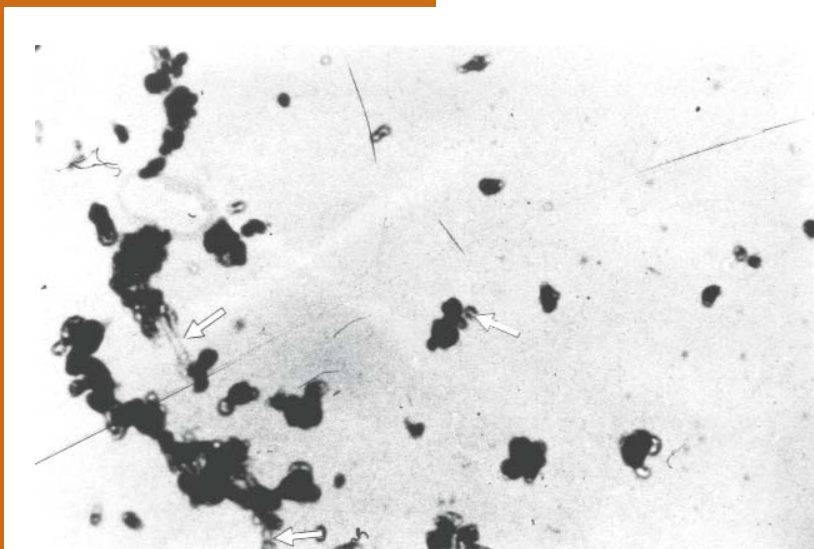
Фокус истраживачког интересовања Лабораторије за молекуларну хематологију (ЛМХ) првобитно је био београдски анемични пацов. Тада се у ЛМХ изучава регулација транскрипције еукариотских гена најсавременијим методама. У исто време, држећи корак са светском науком, у ЛМХ рађена су истраживања у области генске терапије. У 21. веку ЛМХ се окреће најактуелнијој области истраживања – биомедицини. Први пут су у Србији изучаване молекуларне основе таласемије и хематолошких малигнитета (дечије и адултне акутне и хроничне леукемије). Временом су се активности ЛМХ у области хумане молекуларне патологије проширивале отварањем нових истраживачких проблематика, као што су фенилкетонурија и запаљењске болести црева. У ЛМХ су покренута прва истраживања из области фармакогеномике у Србији. Упоредо са научноистраживачким радом, ЛМХ је препознатљива у Србији и шире по разноврсном дијапазону најмодернијих молекуларногенетичких дијагностичких метода које су први пут уведене у овој лабораторији и стављене у службу медицинског сектора. ЛМХ је изузетно активна и у популаризацији и промоцији науке.

Фокус истраживања

Прва истраживања у Лабораторији за молекуларну хематологију (ЛМХ) односила су се на изучавање молекуларне основе наследних анемија. На модел-систему наследне микроцитне, хипохромне анемије (b/b пацов) испитивана је регулација експресије глобинских гена и гена који кодирају протеине мембране еритропоетских ћелија, с циљем поређења са хуманим хемолитичким анемијама. Истраживања протеина који учествују у формирању патолошког фенотипа код анемија проширена су и на хроничну грануломатозну болест.

Истовремено су, први пут у нашој земљи, почела и истраживања из области генске терапије. Конструисани су дефектни ретровирусни вектори и тестирана је ефикасност ретровирусне инфекције сисарских ћелија у култури. Испитивани су механизми регулације експресије хуманог рекомбинованог β -интерферона и први пут је добијена конститутивна експресија овог гена са ретровирусног вектора.

Почетком деведесетих година истраживања у овој лабораторији била су посвећена изучавању матичне ћелије хематопоезе и настављен је рад на генској терапији ретровирусним векторима. Дефектним ретровирусима успешно су трансдуковане перманентне линије хематопоеетских ћелија човека, миша и пацова, чиме је пока-





зано да се произведени вируси могу користити за трансдукцију матичних хелија хематопоезе.

У току и непосредно после 1999. године, сви истраживачи лабораторије за молекуларну хематологију, сем Соње Павловић, одлазе у иностранство или у друге истраживачке лабораторије у оквиру ИМГГИ. Тај моменат означава и прелаз научних активности ЛМХ од истраживања глобинских гена на модел-систему б/б пацова ка биомедицини – молекуларној генетици таласемијских синдрома. Тако је, уз подршку ИМГГИ, др Соња Павловић започела пионирски рад на формирању нове Лабораторије за молекуларну хематологију, у којој је временом отворено и развијено више истраживачких праваца из области биомедицине. Покренута су прва истраживања из области хематолошких малигнитета применом молекуларногенетичких маркера у дијагностици, прогнози и праћењу свих типова леукемија (акутних и хроничних, дечијих и адултних). У периоду од 2006. до 2010. године, истраживачко интересовање ЛМХ за хуману молекуларну патологију се продубљивало, тако да је отворен низ нових истраживачких проблематика, међу којима су и испитивања молекуларне основе фенилкетонурије и запаљењских болести црева код човека (Кронова болест, улцерозни колитис). Поред основних молекуларногенетичких истраживања која су водила бољем разумевању етиологије и корелације генотипа и фенотипа код наведених болести, научноистраживачки рад ЛМХ био је усмерен и на популациону генетику, тј. истраживање популационогенетичких маркера који откривају националне и регионалне специфичности везане за моногенске болести.

Важно је истаћи да су у овом периоду у ЛМХ покренута и прва истраживања из области фармакогенетике/фармакогеномике у Србији. Добијени резултати довели су до измена у протоколу лечења дечијих акутних лимфобластних леукемија, који одговарају генотипу тиопурин-С-метилтрансферазе (*TPMT*). Такође, ЛМХ је промовисала генетичку варијанту *VNTR* (варијабилни број тандемских поновака) у промотору гена *TPMT* као нови фармакогенетички маркер.

На крају овог периода, у ЛМХ је под руководством др Соње Павловић било ангажовано 12 молекуларних биолога, од тога три доктора наука, изузетно успешних истраживача који су стасали управо у овој лабораторији.

Упоредо са научноистраживачким радом, ЛМХ је препознатљива у Србији и шире по разноврсном дијапазону најмодернијих дијагностичких метода које су први пут уведене у овој лабораторији и стављене у службу медицинског сектора. ЛМХ има изузетно плодну сарадњу са медицинским сектором Србије и у корак прати најновије молекуларногенетичке приступе, неопходне за тачну дијагнозу, избор терапије, поуздану прогнозу и успешно праћење тока наведених болести. Важно је истаћи да, од почетка рада ЛМХ у области биомедицине, ниједан пацијент није упућен у иностранство због дијагностиковања таласемија и фенилкетонурија, што је раније била уобичајена пракса.

Посебно је значајна активност ЛМХ у популаризацији и промоцији науке, што се огледа у реали-

fully transduced with defective retroviruses, which showed that they can be used for transduction of hematopoietic stem cells.

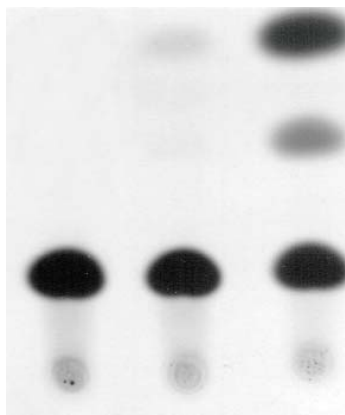
During and just after the year 1999, all research staff of LMH, except for Sonja Pavlović, has left abroad or joined other Laboratories of IMGGE. That moment also signifies a transition of research activities of LMH from studies of b/b rat globin genes to biomedicine – molecular genetics of thalassemia syndromes. Dr Sonja Pavlović, with support of IMGGE, started a pioneer work on forming a new LMH, which in time started and developed more research directions in the field of biomedicine. First studies on hematological malignancies were started, and these studies were based on use of molecular genetic markers in diagnostics, prognosis and monitoring of all types of leukemias (acute and chronic, childhood and adult). In the period from 2006 to 2010, research interest LMH for human molecular pathology was broadened, opening a number of new research goals, such as studies of molecular basis of phenylketonuria and inflammatory bowel diseases (Crohn's disease, ulcerative colitis). In addition to basic molecular genetic research, which led to better understanding of etiology and genotype-phenotype correlation of these diseases, research work of LMH was also aimed at population genetics. This work included studies of population genetic markers that revealed national and regional specificities related to monogenic diseases.

It is important to note that in this period LMH started first research in the field of pharmacogenetics/pharmacogenomics in Serbia. The obtained results have brought to changes in protocols of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia, regarding thiopurine S-methyltransferase genotype. In addition, LMH has introduced a genetic variant of *VNTR* (variable number of tandem repeats) in the promoter of *TPMT* gene as a new pharmacogenetic marker.

At the end of this period, LMH engaged 12 molecular biologists, 3 of which PhDs, exceptionally successful researchers, who grew out right in this Laboratory.

Alongside with the research work, LMH is recognizable in Serbia and beyond for diverse range of modern diagnostic methods, introduced for the first time in LMH and consequently set up in the medical sector. LMH has a productive collaboration with the medical sector of Serbia and follows the newest molecular genetic approaches, which are necessary for exact diagnosis, choice of therapy, reliable prognosis and successful monitoring of disease progression. It is important to note that, from the beginning of the work in biomedicine field, no patient was sent abroad for diagnosis of thalassemia and phenylketonuria, which was common practice before.

Especially important activity of LMH in the field of popularization and promotion of science reflects in realization of project „Short Course of DNAlogy“, financed by Ministry of Science and Technological Development of Republic of Serbia. This project aims to popularize



25
година • years

molecular biology through „hands-on“ experiments. „Traveling laboratory“ has reached several thousands of children in primary and high schools, as well as in kindergartens, museums, culture centers. Under the guidance of dr Sonja Pavlović, members of LMH and other IMGGE Laboratories actively participate in all manifestations that popularize science, such as Science Festival and Researchers' Night, for which European FP7 project was recently granted.

Specificities of some research interests of LMH:

Molecular genetics of thalassemia syndromes

The thalassemia syndromes are hereditary disorders caused by absence or decreased synthesis of one or more hemoglobin polypeptide chains, which leads to anemia. The thalassemias are caused by large number of different genetic defects. Molecular diagnostics of thalassemia is the most reliable method for early detection of the disease.

In collaboration with hematologists, LMH has performed the first prenatal diagnostics of thalassemia in Serbia. A wide range of diagnostic methods has been introduced, including hemoglobin analyses, DNA analyses of the globin genes (PCR, reverse dot blot, DGGE, DNA sequencing). Moreover, a „RDB chip“ was designed for the purpose of quick and economical detection of the most common thalassemia mutations in Serbia. Mutation analyses of globin genes in high-risk families has provided the data about the types and frequencies of thalassemia mutations in Serbia and Montenegro. These mutational and population-genetic studies were the first of the kind in this region.

Genes modifiers of thalassemia syndromes are also being studied in LMH. The research is focused on mutations in γ and α promoter regions, as potential modulators of β -thalassemic phenotype. Furthermore, tertiary gene modifiers are being studied in thalassemia patients with associated thromboembolic disorders.

Molecular genetic markers of proliferation, differentiation and apoptosis in leukemias

The understanding of the pathophysiology of acute lymphoid (ALL), acute myeloid leukemia (AML) and chronic myeloid leukemia (CML) has rapidly advanced due to the molecular

зацији пројекта „Мала школа ДНКлогије“ који је финансирало Министарство науке и технолошког развоја Републике Србије и чији је циљ да популарише молекуларну биологију кроз „уради сам“ експерименте. „Путујућа лабораторија“ стигла је до више хиљада ученика основних и средњих школа широм Србије, до вртића, музеја, културних центара. Под руководством др Соње Павловић, чланови ЛМХ и других лабораторија из ИМГГИ активно учествују у свим манифестацијама које популаришу науку као што су Фестивал науке и Ноћ истраживача, за коју је недавно одобрен и европски ОП7 пројекат.

Специфичности појединих научноистраживачких области

Молекуларна генетика таласемијских синдрома

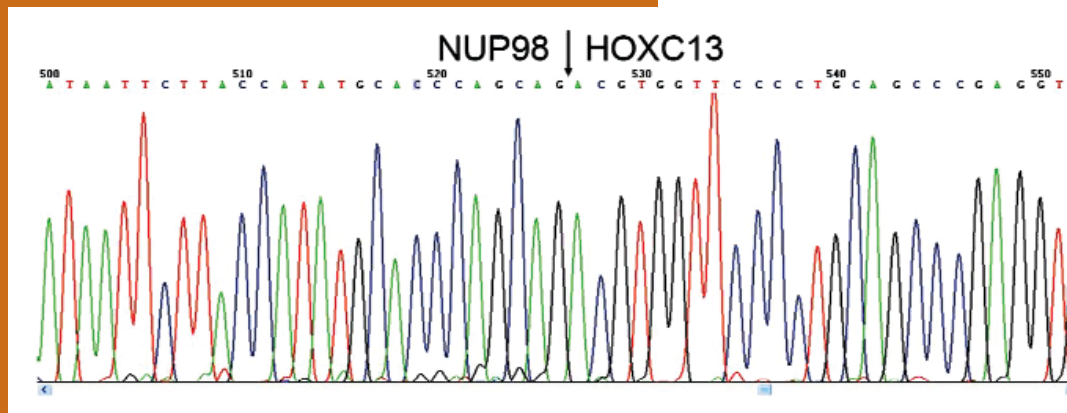
Таласемијски синдроми су наследни поремећаји који су последица одсуства или смањене синтезе једног или више полипептидних ланаца хемоглобина, што узрокује појаву анемије. Таласемије су последица великог броја различитих генетичких дефеката. Молекуларна дијагностика таласемија најпоузданији је метод за рано откривање болести што, због правовремене примене терапије, поправља клиничку слику и ток болести.

ЛМХ је у сарадњи са хематолозима урадила и прве пренаталне дијагнозе ове болести у Србији. С тим циљем, уведен је читав низ метода за дијагностиковање таласемијских синдрома које обухватају анализе хемоглобина и анализе ДНК глобинских гена (ПЦР, реверзни дот блот, ДГГЕ, ДНК секвенцирање), а дизајниран је и „РДБ чип“ за брзо и рентабилно откривање таласемијских мутација које су најчешће у Србији. На основу анализа мутација у глобинским генима код породица са високим ризиком од таласемије добијени су подаци о типу и учесталости таласемијских мутација у Србији и Црној Гори и идентификоване су нове мутације. Ове мутационе и популационогенетичке студије биле су прве те врсте на овим просторима.

У ЛМХ се изучавају и гени-модификатори таласемијских синдрома. Анализирају се мутације у промоторима γ и α феталних глобинских гена, као потенцијални модулатори β -таласемијског фенотипа, као и терцијарни гени модификатори у интересантним случајевима удружености таласемије и тромбоемболијских компликација.

Молекуларногенетички маркери пролиферације, диференцијације и апоптозе код леукемија

Разумевање патофизиологије акутне лимфоидне (АЛЛ), акутне мијелоидне (АМЛ) и хроничне мијелоидне леукемије (ХМЛ) значајно је напредовало захваљујући молекуларногенетичким студијама. У ЛМХ је, први пут у Србији, оптимизирана методологија





којом се генетичке промене, повезане са патогенезом наведених леукемија, откривају на молекуларном нивоу и користе за постављање дијагнозе, детекцију минималне резидуалне болести и прогнозу. Методом РТ-ПЦР детектују се најчешће транслокације у АЛЛ, АМЛ и ХМЛ као и реаранжмани гена за IgH и Т-ћелијски рецептор који су специфични за малигни клон, што је значајно за постављање прецизне дијагнозе и праћење хематолошких малигнитета.

Поред наведеног, у ЛМХ је оптимизиран низ метода за детекцију мутација и одређивање нивоа експресије *FLT3*, *NPM1*, *FAS*, *BCL2*, *BAX*, *BCL2L12* гена у оболелих од АЛЛ и АМЛ. Резултати ових истраживања омогућили су дефинисање прогностичког значаја испитиваних молекуларногенетичких маркера.

У ЛМХ се изучава и молекуларна основа хроничне лимфоцитне леукемије (ХЛЛ), посебно мутациони статус тешких ланаца имуноглобулина који је најстабилнији и најинформативнији прогностички маркер у ХЛЛ. Поред тога, истраживања су усмерена и на експресију *JAK2* гена у мијелопротрофативним неоплазијама (МПН).

Фенилкетонурија

Фенилкетонурија је наследна метаболичка болест чији су узрок мутације у гену за фенилаланин хидроксилазу (*PAH*). У ЛМХ су први пут у Србији оптимизирале молекуларногенетичке методе за откривање свих промена у *PAH*. При анализи српских пацијената оболелих од фенилкетонурије постигнут је ниво детекције од 97% и идентификовано је 20 мутација. Уведена молекуларна дијагностика има значај за постављање прецизније дијагнозе, планирање дијететског режима, генетичко саветовање и отвара могућност за одабир пацијената којима би била од користи терапија новим леком (Куван).

Пионирска анализа популационогенетичких маркера довела је до расветљавања преношења појединачних мутација кроз балканске популације. Ефекат мутација које су детектоване у српској популацији анализиран је у студијама корелације генотипа и фенотипа и у експресионим *in vitro* системима. Једна од ретких *PAH* мутација је тако први пут окарактерисана у *in vitro* системима и сврстана у функционално нулте мутације.

Такође, испитивана је и регулација транскрипције *PAH* гена. У осмом интрону овог гена утврђено је постојање регулаторног елемента који садржи полимор-

genetic studies focused on the molecular mechanism of leukemogenesis. For the first time in Serbia, the methodology used to detect genetic changes associated with pathogenesis of these leukemias, has been optimized in LMH. The most common translocations in ALL, AML and CML, as well as *IgH* and *TCR* rearrangements specific for the malignant clone are being detected using RT-PCR methodology. These analyses are of great importance for proper diagnostics, detection of minimal residual disease and follow-up of patients with hematological malignancies.

In addition, a range of methods for detection of mutations and for determining the expression levels of *FLT3*, *NPM1*, *FAS*, *BCL2*, *BAX*, *BCL2L12* genes in ALL and AML has been optimized in LMH. It enabled evaluation of prognostic significance of these molecular genetic markers.

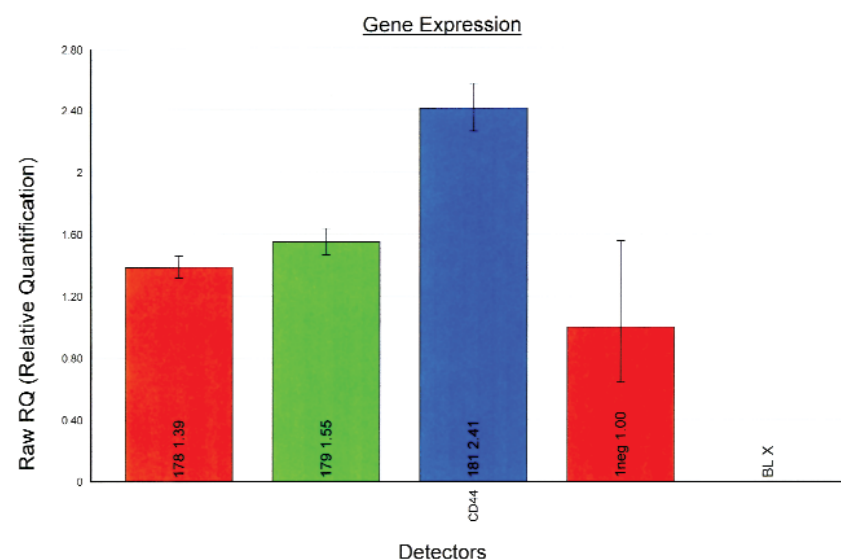
The molecular basis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is also being studied in LMH. The mutational status of immunoglobulin heavy chain genes is of special interest, since it is the most stable and informative marker in CLL. Furthermore, the expression of *JAK2* gene in myeloproliferative neoplasms (MPN) is also being studied in LMH.

Phenylketonuria

Phenylketonuria (PKU) is the most common inborn error of amino acid metabolism in Caucasians. PKU is caused by the deficiency of hepatic enzyme, phenylalanine hydroxylase (*PAH*). Molecular genetic methods for detection of all changes in *PAH* have been optimized for the first time in Serbia in LMH. In the study of Serbian PKU patients, 20 different *PAH* mutations were detected with the detection rate of 97%. Molecular diagnostics of PKU is important for diagnostics, diet planning, genetic counseling and it opens the possibility for choosing the patients who could benefit from the new drug treatment (Kuvan).

Pioneer analysis of population genetic markers has led to elucidation of how particular *PAH* mutations have been transmitted throughout Balkan populations. The effect of mutations, detected in Serbian population, has been analyzed in genotype-phenotype correlation studies and in *in vitro* systems. A rare *PAH* mutation has been characterized for the first time in *in vitro* systems and classified as a functional null mutation.

In addition, transcriptional regulation of *PAH* gene has been studied. A regulatory element con-





taining a polymorphism was discovered in intron 8 of this gene, and it was confirmed that this element has an enhancer function. This was the first time ever that an intronic regulatory element was found within the *PAH* gene.

Inflammatory bowel disease

Inflammatory bowel diseases (IBD-Crohn's disease, ulcerative colitis) manifest as chronic inflammation of gastrointestinal tract. IBD are characterized by genetic heterogeneity and incomplete phenotypic penetrability. For the first time in Serbia, the methods for detection of mutations in *NOD2/CARD15* gene have been optimized in LMH. The analysis of Serbian patients confirmed the association of *CARD15* gene mutations with the increased risk of developing Crohn's disease.

Pharmacogenomics

Thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) is a cytoplasmic enzyme involved in inactivation of thiopurine drugs, currently used in treatment of cancers, autoimmune and inflammatory diseases. Decreased activity of TPMT is associated with severe hematopoietic toxicity in treatment with standard doses of these drugs. For the first time in Serbia, the detection of clinically relevant *TPMT* gene mutations has been optimized in LMH. Based on pharmacogenetic study of Serbian patients, it has been shown that in heterozygous *TPMT* mutation carriers therapeutic protocols should be altered, in terms of lowering thiopurine drugs doses.

The effect of polymorphisms in VNTR regions of *TPMT* gene promoter on transcriptional regulation of this gene has also been studied in LMH. The obtained results have shown that both number and type of VNTRs can influence *TPMT* gene transcription, implying their significance as potential pharmacogenomic markers.

Selected publications

1. Pavlovic S, Mitrovic T, Nikcevic G, Grujicic N, Lazic D, Glisin V, Popovic Z. (1999) The rat β miny-globin promoter: nuclear protein factors and erythroid-specific induction of transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 871-881.
2. Pavlovic S, Urosevic J, Poznanic J, Perisic Lj, Petrucev B, Tosic N, Krivokapic-Dokmanovic L, Janic D, Cvorkov-Drazic M, Bunjevacki G. (2005) Molecular basis and origin of thalassemia syndromes in Serbia. *Acta Haematologica* 113, 175-180.
3. Pavlović S. Talasemijski sindromi – molekularna genetika u savremenoj dijagnostici/ Molecular Genetics and modern Diagnostics of Thalassemia Syndromes (2006). IMGGI, Beograd, Srbija.

физам и функционише као енхансер. Овим је први пут у свету показано постојање регулаторног транскрипционог елемента у оквиру интрона гена *PAH*.

Запаљењске болести црева

Кронова болест и улцерозни колитис испољавају се као хронична инфламација дигестивног тракта и карактеришу се генетичком хетерогеношћу и непотпуном фенотипском пенетрабилношћу. У ЛМХ су први пут у Србији оптимизирани методе за детекцију мутација у *NOD2/CARD15* гену и показана је њихова асоцијација са Кроновом болешћу. На основу анализе српских пацијената оболелих од Кронове болести и улцерозног колитиса, потврђено је да носиоци мутација у *CARD15* гену носе повећан ризик од оболевања од Кронове болести.

Фармакогеномика

Тиопурин-С-метилтрансфераза (TPMT) метаболише тиопуринске лекове, као што су антиканцерозни агенси (6-меркаптопурин и 6-тиогуанин) и имunosупресивни агенс азатиоприн, који се користе у терапији канцера, аутоимуних болести и запаљењских болести црева. Смањена активност TPMT повезана је са тешком хематопоеетском токсичношћу после употребе стандардних доза ових лекова. У ЛМХ је, први пут у Србији, оптимизирана методологија за детекцију клинички релевантних мутација у гену *TPMT*. На основу ретроспективне и проспективне фармакогенетичке студије на српским пацијентима, показано је да код хетерозиготних носилаца мутација у гену *TPMT* треба изменити терапијски протокол смањивањем доза тиопуринских лекова.

У ЛМХ је изучаван и утицај полиморфизама у VNTR региону промотора *TPMT* гена на регулацију транскрипције овог гена. Резултати ових истраживања су показали да број и тип VNTR поновака могу да утичу на транскрипцију гена за *TPMT* и да би могли бити узети у обзир као нови фармакогенетички маркер.

Одабране публикације

1. Pavlovic S, Mitrovic T, Nikcevic G, Grujicic N, Lazic D, Glisin V, Popovic Z. (1999) The rat β miny-globin promoter: nuclear protein factors and erythroid-specific induction of transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 871-881.
2. Pavlovic S, Urosevic J, Poznanic J, Perisic Lj, Petrucev B, Tosic N, Krivokapic-Dokmanovic L, Janic D, Cvorkov-Drazic M, Bunjevacki G. (2005) Molecular basis and origin of thalassemia syndromes in Serbia. *Acta Haematologica* 113, 175-180.
3. Павловић С. Таласемијски синдроми – молекуларна генетика у савременој дијагностици/



Molecular Genetics and modern Diagnostics of Thalassemia Syndromes (2006). ИМГТИ, Београд, Србија.

4. Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucev B, Tosic N, Pavlovic S. (2006) Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther. Drug. Monit.* 28, 800-806.
5. Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov-Drazic M, Petrucev B, Tosic N, Karan-Djurasevic T, Stojanov Lj, Pavlovic S. (2006) Molecular and phenotypic characteristics of phenylketonuria patients in Serbia and Montenegro. *Clin. Genet.* 70, 151-155.
6. Colovic N, Tosic N, Aveic S, Djuric M, Milic N, Bumbasirevic V, Colovic M, Pavlovic S. (2007) Importance of early detection and follow-up of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology* 86, 741-747.
7. Protic M, Pavlovic S, Bojic D, Krstic M, Radojicic Z, Tarabar D, Stevanovic A, Karan Djurasevic T, Godjevac M, Svorcan P, Dapcevic B, Jojic Nj. (2008) CARD15 gene polymorphism in Serbian patients with Crohn's disease: genotype-phenotype analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20 (10), 978-984.
8. Zukic B, Radmilovic M, Stojiljkovic M, Tosic N, Pourfarzad F, Dokmanovic L, Janic D, Colovic N, Philipsen S, Patrinos G, Pavlovic S. (2010) Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in gene transcription. *Pharmacogenomics* 11 (4), 547-557.
9. Stojiljkovic M, Zukic B, Tosic N, Karan-Djurasevic T, Spasovski V, Nikcevic G, Pavlovic S. (2010) Novel transcriptional regulatory element in the phenylalanine hydroxylase gene intron. *Mol. Genet. Metab.* 101 (1), 81-83.
10. Giardine B, Borg J, Higgs DR, Peterson KR, Philipsen S, Maglott D, Singleton BK, Anstee DJ, Basak AN, Clark B, Costa FC, Faustino P, Fedosyuk H, Felice AE, Francina A, Galanello R, Gallivan MV, Georgitsi M, Gibbons RJ, Giordano PC, Harteveld CL, Hoyer JD, Jarvis M, Joly P, Kanavakis E, Kollia P, Menzel S, Miller W, Moradkhani K, Old J, Papachatzopoulou A, Papadakis MN, Papadopoulos P, Pavlovic S, Perseu L, Radmilovic M, Riemer C, Satta S, Schrijver I, Stojiljkovic M, Thein SL, Traeger-Synodinos J, Tully R, Wada T, Waye JS, Wiemann C, Zukic B, Chui DH, Wajcman H, Hardison RC, Patrinos GP. (2011) Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nature Genetics* 43(4):295-301.

Пројекти

- Рекомбинантна ДНК (Генетичко инжењерство) и биотехнологија (пројекат основних истраживања, бр.: 1.41). Потпројекат: Примена технологије рекомбинантне ДНК у каузалној терапији наследних и инфективних обољења. Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1986–1990

4. Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucev B, Tosic N, Pavlovic S. (2006) Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther. Drug. Monit.* 28, 800-806.

5. Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov-Drazic M, Petrucev B, Tosic N, Karan-Djurasevic T, Stojanov Lj, Pavlovic S. (2006) Molecular and phenotypic characteristics of phenylketonuria patients in Serbia and Montenegro. *Clin. Genet.* 70, 151-155.
6. Colovic N, Tosic N, Aveic S, Djuric M, Milic N, Bumbasirevic V, Colovic M, Pavlovic S. (2007) Importance of early detection and follow-up of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology* 86, 741-747.
7. Protic M, Pavlovic S, Bojic D, Krstic M, Radojicic Z, Tarabar D, Stevanovic A, Karan Djurasevic T, Godjevac M, Svorcan P, Dapcevic B, Jojic Nj. (2008) CARD15 gene polymorphism in Serbian patients with Crohn's disease: genotype-phenotype analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20 (10), 978-984.
8. Zukic B, Radmilovic M, Stojiljkovic M, Tosic N, Pourfarzad F, Dokmanovic L, Janic D, Colovic N, Philipsen S, Patrinos G, Pavlovic S. (2010) Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in gene transcription. *Pharmacogenomics* 11 (4), 547-557.
9. Stojiljkovic M, Zukic B, Tosic N, Karan-Djurasevic T, Spasovski V, Nikcevic G, Pavlovic S. (2010) Novel transcriptional regulatory element in the phenylalanine hydroxylase gene intron. *Mol. Genet. Metab.* 101 (1), 81-83.
10. Giardine B, Borg J, Higgs DR, Peterson KR, Philipsen S, Maglott D, Singleton BK, Anstee DJ, Basak AN, Clark B, Costa FC, Faustino P, Fedosyuk H, Felice AE, Francina A, Galanello R, Gallivan MV, Georgitsi M, Gibbons RJ, Giordano PC, Harteveld CL, Hoyer JD, Jarvis M, Joly P, Kanavakis E, Kollia P, Menzel S, Miller W, Moradkhani K, Old J, Papachatzopoulou A, Papadakis MN, Papadopoulos P, Pavlovic S, Perseu L, Radmilovic M, Riemer C, Satta S, Schrijver I, Stojiljkovic M, Thein SL, Traeger-Synodinos J, Tully R, Wada T, Waye JS, Wiemann C, Zukic B, Chui DH, Wajcman H, Hardison RC, Patrinos GP. (2011) Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nature Genetics* 43(4):295-301.

Projects

- Recombinant DNA (Genetic Engineering) and Biotechnology (fundamental research project, No.: 1.41). WP: Application of recombinant DNA technology in therapy of inherited and infection diseases. Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1986–1990



- Anemia Syndrome of b/b Rat (international project No.: JF-789). NIH Bethesda, 1986–1990
- Recombinant DNA in research of gene-protein interactions (fundamental research project, No.: E-1407). WP: Molecular basis of protein transport through cell membrane. Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1991–1995
- Molecular basis of protein transport through cell membrane (fundamental research project, No.: 03E09). Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1996–2000
- Production of retroviral vectors (innovative project, No.: I.3.1223). Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1996–1997
- The Hsp70 proteins in mutant cells (international project, No.: CRP/YUG97-04). ICGEB, 1997–2000
- Production of retroviral vector for application in gene therapy (strategic project, No.: S.6.35.76.0120). Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1998–2000
- Molecular diagnosis of hereditary diseases in medicine (strategic project, No.: S.6.35. 75.0 126). WP: Molecular diagnosis of thalassemia. Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1998–2000
- Mutated gene in different genetic backgrounds (fundamental research project, No.: 1417). Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 2001–2005
- Genomic elements in phenotype modulation (fundamental research project, No.: 143051). Ministry of Science and environmental protection, Republic of Serbia, 2006–2010
- Clonal transformation of hematopoietic stem cells (fundamental research project, No.: 145061). Ministry of Science and environmental protection, Republic of Serbia, 2006–2010
- Health improvement in Serbia through reinforcement of biomedical science and technology “HISERBS” (international project, No.: SSA, FP6-INCO-026357). European Commission, 2006–2009
- European LeukemiaNet – “Strengthen and develop scientific and technological excellence in research and therapy of leukemia (CML, AML, ALL, CLL, MDS, CMPD) by integration of the leading national leukemia networks and their interdisciplinary partner groups in Europe” (international project, No.: FP6-LSHC-CT-2004). European Commission, 2004–2011
- Short course of DNAlogy (science popularisation project). Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia, 2009
- Anemia Syndrome of b/b Rat (страни пројекат, бр.: ЈФ-789). NIH Bethesda, 1986–1990
- Рекомбинантна ДНК у истраживању односа ген-протеин (пројекат основних истраживања, Е-1407). Потпројекат: Молекуларна основа транспорта протеина кроз ћелијску мембрану. Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1991–1995
- Молекуларна основа транспорта протеина кроз ћелијску мембрану (пројекат основних истраживања, бр.: 03Е09). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1996–2000
- Производња ретровирусних вектора (иновациони пројекат, бр.: И.3.1223). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1996–1997
- The Hsp70 proteins in mutant cells (страни пројекат, бр.: ЦПП/ЈУГ97-04). ICGEB, 1997–2000.
- Генска терапија ретровирусним векторима (стратешки пројекат, бр.: С.6.35.76.0120). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1998–2000
- Молекуларно биолошка дијагностика наследних обољења у медицини (стратешки пројекат, бр.: С.6.35.75.0126). Потпројекат: Молекуларна дијагностика таласемија. Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1998–2000
- Мутирани ген у контексту других гена (пројекат основних истраживања, бр.: 1417). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 2001–2005
- Структурни елементи генома у модулацији фенотипа (пројекат основних истраживања, бр.: 143051). Министарство за науку и заштиту животне средине, Републике Србије, 2006–2010
- Молекуларно-генски маркери клонског преображаја матичних ћелија хематопоезе (пројекат основних истраживања, бр. 145061). Министарство за науку и заштиту животне средине, Републике Србије, 2006–2010
- Health improvement in Serbia through reinforcement of biomedical science and technology “HISERBS” (страни пројекат, бр.: ССА, ФП6-ИНЦО-026357). European Commission, 2006–2009
- European LeukemiaNet - “Strengthen and develop scientific and technological excellence in research and therapy of leukemia (CML, AML, ALL, CLL, MDS, CMPD) by integration of the leading national leukemia networks and their interdisciplinary partner groups in Europe” (страни пројекат, бр.: ФП6, ЛСХЦ-ЦТ-2004) European Commission, 2004–2011
- Мала школа ДНКлогије (пројекат популаризације науке). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2009
- Мала школа ДНКлогије (пројекат популаризације науке). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2010



- Ретке болести: молекуларна патофизиологија, дијагностички и терапијски модалитети и социјални, етички и правни аспекти (пројекат интегралног и интердисциплинарног истраживања, бр.: 41004). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2011–2014
- Researchers'Night Fever „RENIFEVER“ (страни пројекат, бр.: ЦСА-СА, FP7-PEOPLE-2011-NIGHT- 287432). European Commission, 2011
- Мала школа ДНКлогије (пројекат популаризације науке). Центар за популаризацију науке, Републике Србије, 2011

Награде

- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље дипломске радове из области молекуларне биологије у Србији (Љубица Перишић, 2003; Маја Стојиљковић, 2004; Ана Стевановић, 2005; Никола Котур, 2009; Kristel Klaassen, 2010)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље докторске дисертације из области молекуларне биологије у Србији (Бранка Зукић, 2010)
- Награда за младе истраживаче на Десетом интернационалном конгресу о урођеним болестима метаболизма (Маја Стојиљковић, 2006)
- Прва награда за младе истраживаче на HUGO радионици (Human Genom Organization Mutation Detection Workshop, Ротердам, Холандија) за рад “Polymorphisms in the phenylalanine hydroxylase gene as modulators of phenotype and genetic population markers” (Маја Стојиљковић, 2008)

- Short course of DNAlogy (science popularisation project). Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia, 2010
- Rare diseases: Molecular Pathophysiology, Diagnostic and Therapeutic Modalities and Social, Ethical and Legal Aspects (integrative and interdisciplinary research project, No. 41004). Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia, 2011–2014
- Researchers'Night Fever „RENIFEVER“ (international project, No.: CSA-SA, FP7-PEOPLE-2011-NIGHT- 287432). European Commission, 2011
- Short course of DNAlogy (science popularisation project). Center for Popularization of Science, Republic of Serbia, 2011

Awards

- Awards of “Goran Ljubijankić” Foundation for best diploma thesis in the field of molecular biology in Serbia (Ljubica Perišić, 2003; Maja Stojiljković, 2004; Ana Stevanović, 2005; Nikola Kotur, 2009; Kristel Klaassen, 2010)
- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best doctoral thesis in the field of molecular biology in Serbia (Branka Zukić, 2010)
- Young Investigators Award in the 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism according to outstanding presentation, Tokyo, Japan (Maja Stojiljković, 2006)
- First HUGO Young Fellowship Award at the HUGO Mutation Detection Training Course, Rotherdam, The Netherlands, for “Polymorphisms in the phenylalanine hydroxylase gene as modulators of phenotype and genetic population markers” (Maja Stojiljković, 2008)



25
година - usara

Лабораторија за молекуларну биологију
Laboratory for Molecular Biology



Laboratory for Molecular Biology

Head: Dragica Radojković, PhD, Principal Research Fellow

Research team:

Snežana Kojic, PhD
Jelena Kušić Tišma, PhD
Aleksandra Divac, PhD
Đorđe Francuski, PhD
Aleksandra Nikolić, PhD
Valentina Đorđević, PhD
Ljiljana Rakićević, PhD
Marija Stanković, PhD
Branko Tomić, BSc
Aleksandra Nestorović, BSc
Mila Ljujić, BSc
Iva Pruner, BSc

Лабораторија за молекуларну биологију

Руководилац: др Драгица Радојковић, научни саветник

Истраживачки тим:

др Снежана Којић
др Јелена Кушић Тишма
др Александра Дивац
др Ђорђе Француски
др Александра Николић
др Валентина Ђорђевић
др Љиљана Ракићевић
др Марија Станковић
Бранко Томић
Александра Несторовић
Мила Љујић
Ива Прунер

25

година • years

Abstract

From its establishment, research in Laboratory for Molecular Biology (LMB) has been oriented to molecular biology of Eukaryotes in different model systems. Basic research is directed towards: genotype-phenotype correlation, DNA-protein interactions in DNA replication initiation and functional characterization of muscle cell proteins. LMB also set the foundation for plant molecular biology group which was later established as a new laboratory within IMGGE. The applied science has been focussed on setting up and application of molecular diagnostics of human diseases. LMB was the first laboratory in our country that introduced molecular testing of cystic fibrosis, and among first labs that employed DNA markers in paternity testing. Within the past 25 years, LMB became a successful team in basic and applied sciences participating in numerous national and international projects. Members of the laboratory are involved in the realization of PhD programme "Molecular biology" at Faculty of Biology, University of Belgrade. They also represent Serbian scientific community in international organisations ORPHANET and EPMA.

Research focus

From its establishment, research in Laboratory for Molecular Biology (LMB) is oriented to molecular biology of eukaryotes. Following scientific strategy of IMGGE (basic research:applied research ratio of 60:40) basic research was directed toward sequence-dependent structural variations of DNA while applied science was dealing with molecular diagnostics of human diseases (cystic fibrosis and human papillomavirus detection in different types of cervical lesions). Later, these type of research lead to vaccine production for cervical cancer. First data about type and frequency of *CFTR* mutations in Serbian population was generated, setting a foundation for long-lasting collaboration with CF Network and participation in international projects and databases.

Mutation analysis included standardization and introduction of new diagnostic methods. Innovations and modifications were incorporated in various aspects of mutation detection - biological material used as a source of DNA and methodology applied for analysis of selected DNA fragments (documented in attached bibliography).

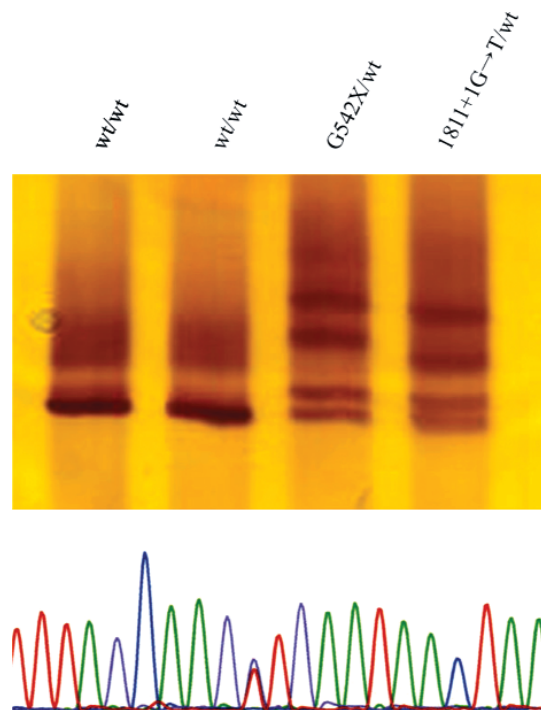
Апстракт

Лабораторија за молекуларну биологију (ЛМБ) од оснивања се оријентисала на молекуларну биологију еукариота на различитим модел-системима. Научно истраживачко интересовање ЛМБ укључује: проучавање корелације генотипа са фенотипом, изучавање ДНК-протеин интеракција у иницијацији репликације ДНК и функционалну карактеризацију протеина мишићне ћелије. У оквиру ЛМБ формирана је и група за рад на молекуларној биологији биљака, која се касније издвојила у засебну лабораторију. Примењена истраживања оријентисана су на освајање и примену метода молекуларне дијагностике болести човека. ЛМБ је била прва лабораторија у нашој земљи која је увела постнаталну и пренаталну дијагностику цистичне фиброзе, а такође и једна од првих лабораторија у којој је уведена метода утврђивања очинства анализом ДНК маркера. У протеклих 25 година ЛМБ се развила у тим који успешно обавља научне и стручне задатке, учествује у бројним националним и међународним пројектима, у извођењу докторског програма Молекуларна биологија на Биолошком факултету Универзитета у Београду и представља нашу научну заједницу у међународним организацијама ORPHANET и EPMA.

Фокус истраживања

Лабораторија за молекуларну биологију (ЛМБ) је од оснивања усмерена на истраживања у области молекуларне биологије еукариота. Пратећи политику упоредних истраживања – основних и примењених, у оквирном односу 60:40, усвојену при оснивању Института, у првом пројектном периоду основна истраживања била су усмерена на одређивање зависности локалне структуре ДНК од редоследа нуклеотида, а примењена истраживања на освајање метода молекуларне дијагностике, на примеру моногенског наследног обољења, цистичне фиброзе (ЦФ). Одређивано је и присуство ДНК хуманих папилома вируса у цервикалним лезијама и утврђивана је корелација са хистопатолошким налазима. Овај тип истраживања је касније (у свету) довео до производње вакцине против карцинома грлића материце. Такође су добијени први подаци о типовима и заступљености мутација у *CFTR* гену у нашој популацији који су укључени и у европске студије чиме је постављена основа за дугогодишњу сарадњу у оквиру CF Network и учествовање у неколико међународних пројеката и база података.

Ова истраживања довела су до стандардизације и увођења нових дијагностичких метода, њихових иновација и модификација, које су се односиле како на извор биолошког материјала који се може користити за детектовање мутација тако и на примену постојећих метода за анализу ци-



Nikolic A, Milosevic K, Divac A, Ljubic M, Grkovic S, Nestorovic B. Novel *cftr* gene sequence variation in Serbian patient with idiopathic disseminated bronchiectasis. *Fetal Pediatr Pathol.* 2010 Jan;29(2):95-8.



љних фрагмената ДНК, што се може видети из приложене библиографије. Тако су за добијање материјала за анализу коришћени узорци из неонаталног скрининга на фенилкетонурију, неивијабилне ћелије супернатанта културе ћелија амнионске течности, директно умножавање ДНК из епителијалних ћелија оралне мукозе и узорци пуне крви. За анализу одређених мутација коришћен је асиметричан нерадиоактиван PCR у комбинацији са SSCP, електрофореза на геловима са градијентима денатуришућег агенса и њихово бојење сребром, а касније и методе аутоматског секвенцирања ДНК.

У породицама са ризиком од цистичне фиброзе рађене су пренаталне дијагнозе (први пут код нас), а у тим породицама испитиване су и мутације у *CFTR* гену. Поред анализе *CFTR* гена пацијената са ЦФ, ове анализе рађене су и код пацијената са атипичном ЦФ, као и код обољења у чију је етиологију укључен *CFTR* ген (инфертилитет код мушкараца, хронични панкреатитис, дисеминиране бронхијектазије).

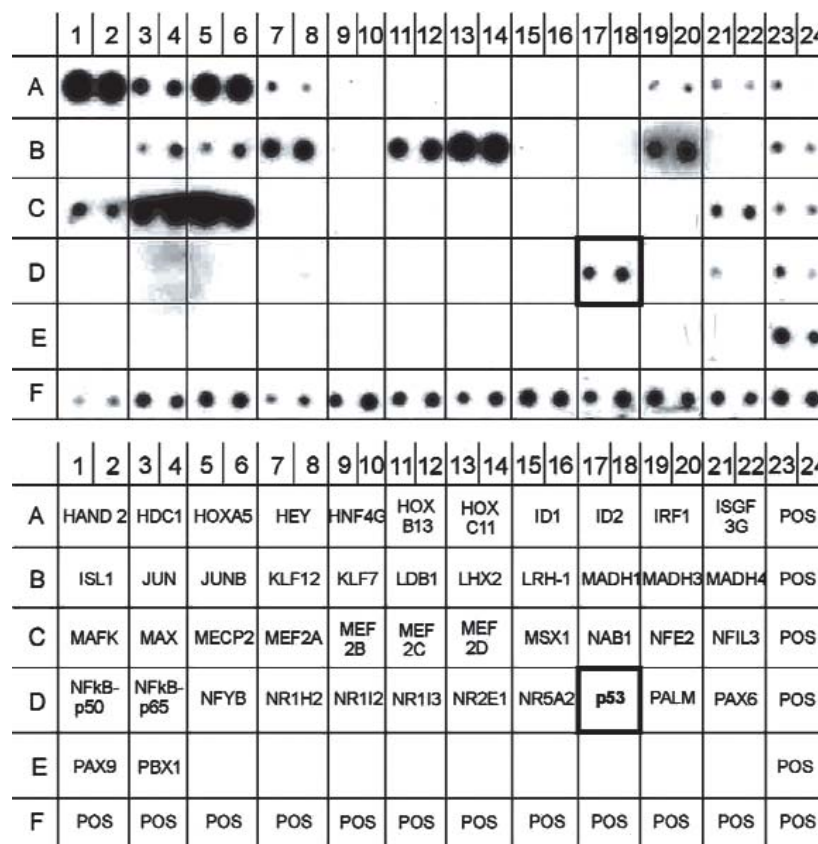
Радови везани за молекуларну дијагностику имали су значајну улогу у информисању лекара о могућностима и предностима молекуларне дијагностике која се код нас дотад није примењивала. Подаци добијани анализом мутација у наведеним генима попуњавали су празнину која је у том погледу постојала за нашу популацију на карти Европе. Одређивање мутација у генима одабраним за молекуларну дијагностику (*CFTR*, *FV*, *FII*, *MTHFR*, *A1AT*) довело је и до испитивања њихове регулације, чиме је потврђена веза између основних и примењених истраживања. Квалитет и значај ових радова за нашу земљу потврђени су и колаборационим пројектом UNIDO-а, који је привремено обустављен због санкција, да би се касније обновио са Међународним центром за генетичко инжењерство и биотехнологију (ICGEB), као и кроз пројекат билатералне сарадње са Бугарском и EUROAGENTEST пројекат у оквиру FP6 међународног програма. У сарадњи са Универзитетом Ерасмус у Холандији оформљена је прва национална мутациона база података наследних болести у Србији (www.goldenhelix.org).

Репертоар испитиваних гена је стално прошириван, тако да се сада за испитивање зависности фенотипа од промена на нивоу ДНК испитују групе гена које учествују у различитим

Biological samples were collected from different sources: samples for phenylketonuria screening (Guthrie cards), nonviable amniotic fluid cells, bucal swabs and peripheral blood. Method used for mutation detection encompasses non-radioactive asymmetric PCR in combination with Single Stranded Conformation Polymorphism, Denaturation Gradient Gel Electrophoresis and automated DNA sequencing.

In families at risk for cystic fibrosis (CF), mutation analysis of *CFTR* gene was conducted and, for the first time in our country, prenatal diagnosis for CF was performed. In addition to patients with CF, *CFTR* gene analysis was carried out in patients with atypical CF, as well as in *CFTR* related disorders (male infertility, chronic pancreatitis, disseminated bronchiectasis).

Furthermore, these studies had significant educational role in informing medical doctors regarding the possibilities and advantages of molecular diagnostics. Data collected from mutation analysis of *CFTR*, *FV*, *FII*, *MTHFR* and *A1AT* genes filled the gap in allele frequencies for Serbian population within the European population map. The mutation analysis of selected genes was the starting point for further studies of their regulation and genotype-phenotype correlation, verifying the link between basic and applied research. Quality and significance of these studies was confirmed through UNIDO collaboration project (temporary suspended due to sanctions), which has been renewed as a ICGEB research grant, as well as through bilateral cooperation project with Bulgaria and EUROAGENTEST project in EU's Framework Programme 6. Collaboration with Erasmus University in Holland set up first national mutation databases for hereditary diseases in Serbia (www.goldenhelix.org).



Kojić S, Nestorović A, Rakićević T, Belgrano A, Stanković M, Divac A, Faulkner G. (2010) A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. Arch. Biochem. Biophys. 502(1), 60-67.

As the number of analyzed genes was constantly growing, current studies of phenotype-genotype correlation comprise genes involved in different types of disorders: respiratory (HOBP, CF, asthma), hemostasis (thrombosis), malignant (adenocarcinoma, colorectal and lung cancer), gastroenterological (chronic pancreatitis) and cardiovascular diseases. Common characteristic of selected genes is their involvement in hemostasis, host defense, inflammatory processes and protection from oxidative stress. Association studies have elucidated some gene alleles to have potential role in phenotype modulation. Depending on the observed DNA variation, further analysis on transcriptional or protein level has been conducted. Final aim is to reveal combined modulatory role of different genes, as well as to elucidate DNA-protein and protein-protein interaction associated with different phenotype expression. These investigations led to extensive collaborations with medical institutions in Serbia and worldwide.

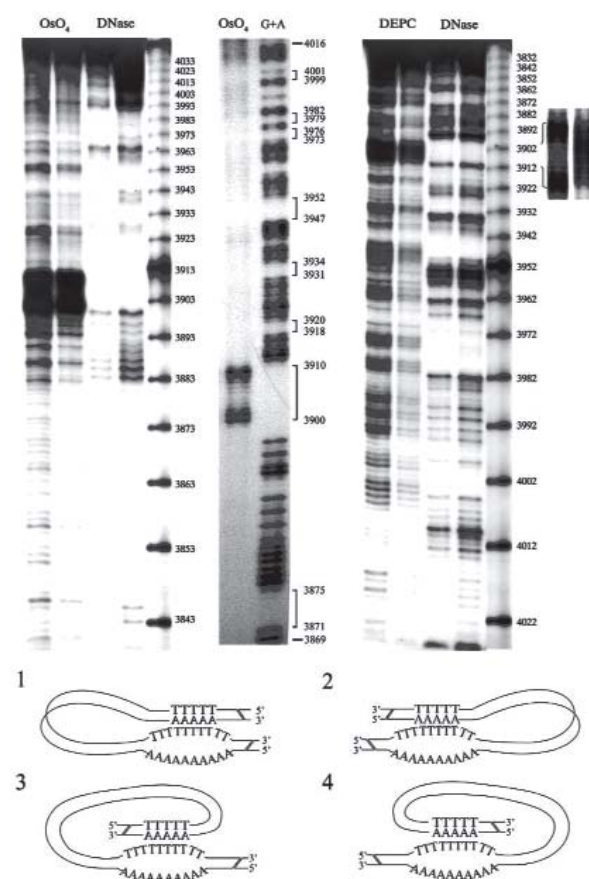
Sequence-dependent structural variations of DNA demonstrated by DNase I digestion, has revealed the presence of DNA bending not only in AT rich regions, but also in GC rich ones. Experiments with synthetic polynucleotides have shown opposite groove-directed curvature of GGGCCC and AAAAA sequence elements.

Having in mind that local DNA structure could affect protein-DNA recognition, research has been expanded to protein-DNA interactions within the scope of fundamental cell process – DNA replication. *Drosophila melanogaster* early embryos was used as a model system, as they are characterised with intensive DNA synthesis and rich in proteins involved in DNA replication. Specifically designed DNA binding sites were used for selection of proteins that could be involved in DNA replication such as dhel III helicase, 3'-exonuclease and nucleases inhibited by ATP (Den1, Den2 and Den3). Afterwards, the components involved in human DNA replication were used (lamin B2 origin of replication and Orc4, subunit 4 of human ORC). Noncanonical DNA elements were

типovima poremeћаја – респираторним (хронична опструктивна болест плућа, ЦФ, астма), хемостатским (тромбозе), малигним (аденокарцином панкреаса, колоректални канцер, карцином плућа), гастроентеролошким болестима (хронични панкреатитис) и кардиоваскуларним болестима. Заједничко за већину ових одабраних група гена јесте учешће у одржавању хемостазе, одбрани организма, запаљењским процесима и заштити од оксидативног стреса јер они утичу на етиологију великог броја болести. За гене, тј. алеле, за које се утврди на основу асоцијативних студија да су потенцијални модулатори фенотипа врши се даља анализа на транскрипционом или протеинском нивоу, зависно од нивоа на којем је уочен ефект промене на ДНК. Крајњи циљ јесте утврђивање комбинованог модулаторског ефекта различитих гена као и одређивање ДНК-протеин и протеин-протеин интеракција које утичу на фенотип. Ова истраживања довела су до сарадње са више медицинских установа код нас и у свету.

Коришћење DNase I као сонде за испитивање локалних структура ДНК зависних од секвенци нуклеотида показало је да до закривљења ДНК може доћи и на деловима богатим GC паровима, а не само у деловима ДНК богатим AA/TT, како се до тада сматрало. Провере са синтетичким полинуклеотидима показале су да низови GGGCCC савијају ДНК у супротном смеру од закривљења до којих долази у AAAAA деловима.

Како специфичности локалне структуре ДНК могу утицати на препознавање одређених делова ДНК од стране протеина, истраживања су проширена на интеракције ДНК и протеина, посебно у оквиру једног од најважнијих процеса – репликације ДНК. Ова истраживања прво су вршена на раним ембрионима *Drosophila melanogaster* који се карактеришу интензивном синтезом ДНК, као погодном извору протеина који учествују у репликацији. Дизајнирањем специфичних места везивања за ДНК, а и другим експерименталним приступима, селектовани су протеини који се везују за та места, као и неколико других ензима који по својим карактеристикама могу бити учесници у процесу репликације ДНК. То су хеликаза dhel III, 3'-егзонуклеаза и нуклеаза Den1, Den2 и Den3, које инхибира АТР. Касније су коришћене компоненте које учествују у репликацији хумане ДНК (старт репликације ламина В2 и субјединица 4 хуманог ORC, Orc4). Нађено је да су у оквиру *ori* репликације могуће интрамолекулске троланчане структуре ДНК, што такође може да служи као знак



Kušić J, Kojić S, Divac A, Stefanović D (2005) Noncanonical DNA elements in the lamin B2 origin of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 280(11): 9848-9854.



распознавања одређених делова ДНК за интеракције са протеинима. Показано је да иницијациони протеин Orc4 не само да претежно интерагује са троланчаном ДНК, што је први налаз ове врсте, него и подстиче њено формирање. Ова истраживања довела су до заједничког пројекта са ICGEB-ом.

У оквиру сарадње са ICGEB-ом започета су и истраживања на карактеризацији Ankrd2, протеина скелетних мишића. Установљено је да овај протеин представља везу између саркомере и једра у скелетном мишићу. Антителима на Ankrd2 анализирана је његова локализација у мишићној ћелији и експресија у различитим ткивима. Показана је и интеракција Ankrd2 са саркомерним протеином телетонином, као и са транскрипционим факторима p53, YB-1 и PML. За други протеин фамилије MARP – Ankrd1/CARP уочена је нова, важна функција – улога коактиватора протеина p53, познатог супресора тумора. На основу тих налаза разматра се и улога протеина фамилије MARP у молекулским механизмима неуромишићних и кардиоваскуларних болести.

У Лабораторији за молекуларну биологију формирана је и група за рад на молекуларној биологији биљака, која је за предмет почетних испитивања изабрала резервне протеине хељде (*Fagopyrum esculentum* Moench). Поред изоловања и карактерисања ових протеина, направљене су и cDNA библиотеке у различитим периодима развића семена, што је проширило испитивања и на друге протеине семена, нарочито на протеин типа металотионеина. Познавање молекуларне биологије биљака и експерименталних приступа у тој области довело је до разраде теста за утврђивање постојања генетичких модификација семена соје (први пут код нас). Сарадња са фирмом „Сојапротеин“ довела је до развоја њихове лабораторије за проверу семена соје на генетичке модификације. Ова група се касније издвојила у засебну лабораторију, под руководством др Весне Максимовић, и наставила успешно да ради на основним и на примењеним истраживањима.

Током протеклих 25 година сарадници Лабораторије за молекуларну биологију ишли су на краћа или дужа усавршавања. Мада је доста млађих сарадника отишло за стално у потрази за бољим условима рада, срећна је околност што су се три сараднице (др Драгана Стефановић, др Драгица Радојковић и др Снежана Којић) вратиле после трогодишњег боравка на страним универзитетима (KUL, Белгија) и међународним институтима (ICGEB, Италија), тако да су, после одласка у пензију првог руководиоца Лабораторије, др Ане Савић, ред. проф. Универзитета у Београду, могле да преузму руковођење Лабораторијом и прошире првобитни научни репертоар. На основу објављених радова, развијене међународне сарадње и добро ранжираних пројеката, може се закључити да се током 25 година постојања Лабораторија развила у тим који успешно обавља научне и стручне задатке, активно учествује у извођењу докторског програма Молекуларна биологија на Биолошком факултету Универзитета у Београду и репрезентује нашу научну заједницу у међународним организацијама ORPHANET и EPMA.

found within functionally essential *ori* sequences. In addition, it was shown that initiation protein Orc4 could mediate formation of these structures and has binding preferences toward triple stranded DNA. Combined results suggested potential role of unorthodox DNA structures in origin recognition by initiation protein. These studies were also supported through two ICGEB research grants.

In the framework of cooperation with the ICGEB, a research on characterization of Ankrd2 protein has been started. It has been found that Ankrd2 represents a functional link between the sarcomere and the nucleus in the skeletal muscle. Anti-Ankrd2 antibodies enabled profiling of Ankrd2 distribution in cell compartments, in different tissues and during differentiation of skeletal muscle cells. A novel important function was demonstrated for another MARP family member, Ankrd1/CARP which behaves as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. Based on these results we are currently studying the role of the MARP family members in molecular mechanisms of the neuromuscular and cardiovascular diseases.

Laboratory for Molecular Biology set a foundation for plant molecular biology group that has initially analyzed buckwheat seed storage proteins (*Fagopyrum esculentum* Moench). Construction of cDNA library of developing buckwheat seed expanded investigation on other seed proteins, especially on methalotionein type. For the first time in our country, molecular testing for genetically modified soybean was introduced and standardized. Our experience significantly contributed to the establishment of the new laboratory for genetic testing of modified soybean in “Sojaprotein” company. Under the leadership of dr Vesna Maksimovic this group set up a new laboratory within IMGGE and successfully continue to perform basic and applied research in the field of plant molecular biology.

During last 25 years, members of the Laboratory for Molecular Biology have been sent for short and long term trainings. Even though many members left the country searching for better research conditions, three of them (dr Dragana Stefanović, dr Dragica Radojković and dr Snežana Kojić) came back after being abroad at Universities (KUL, Belgium) or Institutes (ICGEB, Italy). They took leadership of the Laboratory after retirement of the first laboratory leader Prof. dr Ana Savić, full professor at Belgrade University. Published articles, international collaborations and good ranking of laboratory projects indicate that the Laboratory has developed in a successful and professional research team. Laboratory members are actively engaged in PhD program “Molecular Biology” at Faculty of Biology, University of Belgrade, as well as in representing our scientific community in international organizations ORPHANET and EPMA.

Selected publications

1. Brukner-Dabović B, Radojković D, Savić J, Sretenović Z, Savić A. (1989) DNA probes in diagnostics of cystic fibrosis. Yugoslav Pediat. 32, 16-20.



2. Brukner I, Jurukovski V, Savić A. (1990) Sequence-dependent structural variations of DNA revealed by DNase I. *Nucl.Acids Res.*18, 891-894.
3. Brukner-Dabović B, Radojković D, Minić P, Savić J, Savić A. (1992) Frequency of the F508 deletion and G551D, R553X and G542X mutations in Yugoslav CF patients. *Hum. Genet.* 88, 699-700.
4. Krajinović M, Lazić J, Stanimirović B, Diklić V, Savić A. (1993) The E2 region of HPV16 in relation to different types of cervical lesions. *J. Med. Virol.* 41, 1-5.
5. Todorović V, Kojić S, Vujanac M, Savić A, Stefanović D. (1996) Novel DNA-binding protein from *Drosophila* embryos identified by binding site selection. *FEBS Lett.* 396, 99-102.
6. Brkljačić J, Maksimović V, Radović S, Miljuš J, Ninković S, Savić A. Construction and analysis of cDNA library from developing buckwheat seed. In: *Advances in Buckwheat Research*, pp.V:1-8 (1998). International Buckwheat Research Association.
7. Miković D, Rakićević Lj, Kovač M, Radojković D. (2000) The Incidence of Factor V Leiden in Yugoslav Thrombophilic Patients and Its Relationship to the Laboratory Diagnosis of APC Resistance. *Thromb. Haemost.* 84, 823-824.
8. Kušić J, Kojić S, Divac A, Stefanović D (2005) Noncanonical DNA elements in the lamin B2 origin of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 280(11), 9848-9854.
9. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojković D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J. Cyst. Fibros.* 7(3), 179-196.
10. Kojić S, Nestorović A, Rakićević L, Belgrano A, Stanković M, Divac A, Faulkner G. (2010) A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 502(1), 60-67.

Одабране публикације

1. Brukner-Dabović B, Radojković D, Savić J, Sretenović Z, Savić A. (1989) DNA probes in diagnostics of cystic fibrosis. *Yugoslav Pediat.* 32, 16-20.
2. Brukner I, Jurukovski V, Savić A. (1990) Sequence-dependent structural variations of DNA revealed by DNase I. *Nucl.Acids Res.*18, 891-894
3. Brukner-Dabović B, Radojković D, Minić P, Savić J, Savić A. (1992) Frequency of the F508 deletion and G551D, R553X and G542X mutations in Yugoslav CF patients. *Hum. Genet.* 88, 699-700.
4. Krajinović M, Lazić J, Stanimirović B, Diklić V, Savić A. (1993) The E2 region of HPV16 in relation to different types of cervical lesions. *J. Med. Virol.* 41, 1-5.
5. Todorović V, Kojić S, Vujanac M, Savić A, Stefanović D. (1996) Novel DNA-binding protein from *Drosophila* embryos identified by binding site selection. *FEBS Lett.* 396, 99-102.
6. Brkljačić J, Maksimović V, Radović S, Miljuš J, Ninković S, Savić A. Construction and analysis of cDNA library from developing buckwheat seed. In: *Advances in Buckwheat Research*, pp.V:1-8 (1998). International Buckwheat Research Association.
7. Miković D, Rakićević Lj, Kovač M, Radojković D. (2000) The Incidence of Factor V Leiden in Yugoslav Thrombophilic Patients and Its Relationship to the Laboratory Diagnosis of APC Resistance. *Thromb. Haemost.* 84, 823-824.
8. Kušić J, Kojić S, Divac A, Stefanović D (2005) Noncanonical DNA elements in the lamin B2 origin of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 280(11), 9848-9854.
9. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojković D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J. Cyst. Fibros.* 7(3), 179-196.
10. Kojić S, Nestorović A, Rakićević L, Belgrano A, Stanković M, Divac A, Faulkner G. (2010) A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 502(1), 60-67.

Пројекти

- Projects**
- Recombinant DNA and biotechnology (strategic project). Work package: Structural and functional polymorphism of genomic DNA. Funded by MSTRS (1986–1990)

- Рекомбинантна ДНК (Генетичко инжењерство) и биотехнологија (пројекат основних истраживања). Потпројекат: Структурни и функционални полиморфизам геномских ДНК. Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1986–1990



- Рекомбинатна ДНК у истраживању односа ген-протеин (пројекат основних истраживања). Потпројекат: Иницијација репликације еукариотских ДНК- карактерисање неких учесника. Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1991–1995
- Кодирајуће и некодирајуће секвенце ДНК (основна истраживања, бр. 03E12). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1996–2000
- Molecular Diagnostics of Genetic Diseases (међународни пројекат CRP/YUG96-05). International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy, 1997–1999
- Молекуларна дијагностика најчешћих наследних моногенских болести (билатерална сарадња са Републиком Бугарском). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1998–1999
- Молекуларно биолошка дијагностика наследних обољења у медицини (стратешки пројекат). Потпројекат: Припрема за генетичко претраживање (“screening”) мутација у гену за CF. Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1998–2000
- Мутирани ген у контексту других гена (основна истраживања, бр. 1417). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 2001–2005
- Creation and use of the library of aptamers specific for HsOrc4 (међународни пројекат CRP/YUG03-01). International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy, 2004–2006
- EUROGENTEST (међународни пројекат, FP6 – 512148). Европска унија, 2005–2009
- Структурни елементи генома у модулатији фенотипа (основна истраживања, бр. 143051Б). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 2006–2010
- The role of human skeletal muscle protein ANKRD2/ARPP in striated muscle (међународни пројекат CRP/YUG05-01). International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy, 2006–2008
- Structural alterations of DNA induced by initiator protein (међународни пројекат, CRP/YUG08-01). International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy, 2009–2011
- Комплексне болести као модел систем за проучавање модулатије фенотипа-структурална и функционална анализа молекуларних биомаркера (основна истраживања, бр.173008). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2011–2014
- EUGT2 (међународни пројекат, FP7-261469). Европска унија, 2011–2013

- Recombinant DNA in the investigation of the gene - protein relation (strategic project). Work package: Initiation of eukaryotic DNA replication - description of participants. Funded by MSTRS (1991–1995)
- Coding and non-coding DNA sequences. Funded by MSTRS, grant 03E12 (1996–2000)
- Molecular diagnostics of genetic diseases, collaboration project, funded by International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy CRP/YUG-96-05 (1997–2000)
- Molecular diagnostics of the most common inherited monogenic diseases. Collaboration with Republic of Bulgaria, funded by MSTRS (1998–1999)
- Molecular diagnostics of inherited diseases in medicine (strategic project). Work package: Basis for the mutation screening in the CF gene. Funded by MSTRS (1998–2000).
- Mutated gene in different genetic backgrounds. Funded by MSEPRS, grant 1417 (2001–2005)
- Creation and use of the library of aptamers highly specific for HsORC4, collaboration project, funded by International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy, CRP/YUG03-01, (2004–2006)
- EUROGENTEST, Network of excellence, EU project, FP6-512148 (2005–2009).
- Genomic elements in phenotype modulation, funded by MSEPRS, 143051, (2006–2010)
- The role of human skeletal muscle protein Ankrd 2/Arpp in striated muscle, collaboration project, funded by International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy, CRP/YUG05-01 (2006–2008)
- Structural alterations of DNA induced by initiator protein, collaboration project, funded by International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Italy, CRP/YUG08-01 (2009–2011)
- Complex diseases as a model system for phenotype modulation- structural and functional analysis of molecular biomarkers. Funded by MSTRS, 173008 (2011–2014)
- EUGT2, EU project, FP7-261469 (2011–2013)

Awards

- Aleksandra Divac 2003 “ERS Silver Sponsorship” – European Respiratory Society 2003 Congress
- Valentina Djordjevic 2003 “ISTH Developnig World Scientist Grant” – XIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis



- Dragana Stefanovic 2004 awarded researcher in the field of biology for results in year 2002
- Valentina Djordjevic 2004 awarded researcher in the field of biology for results in year 2002
- Marija Stankovic 2005 "ERS Bronze Sponsorship" – 15th European Respiratory Society Annual Congress
- Mila Ljubic 2006 "ERS Gold Sponsorship" – 16th European Respiratory Society Annual Congress
- Mila Ljubic 2006 FEBS travel and participation grant – International Free Radical Summer School: Biomarkers of oxidative stress and responses, Spetses Island, Greece
- Marija Stankovic 2006 FEBS travel and participation grant – International Free Radical Summer School: Biomarkers of oxidative stress and responses, Spetses Island, Greece
- Marija Stankovic 2005 "ERS Silver Sponsorship" – 17th European Respiratory Society Annual Congress
- Marija Stankovic 2007 Participation grant – 9th International Meeting Human Genome Variation and Complex Genome Analysis
- Valentina Djordjevic 2007 "ISTH Developnig World Scientist Grant" – XXI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis
- Aleksandra Nikolic 2007 "Developing Nations Travel Grant" – 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
- Aleksandra Nikolic, Aleksandra Divac, Mila Ljubic 2008 3rd place in category Biology - Potentials at the competition Best Technological Innovation Award
- Sandra Vranic 2008 2nd award of the "Goran Ljubijankić" Foundation for the best graduate work in molecular biology in 2007
- Aleksandra Divac 2008 "Young Scientist Award" – "First Eastern European CF Conference: 'What's New in the Diagnosis, Treatment and Prevention of Cystic Fibrosis?'"
- Dragica Radojkovic 2008 "Top 10 Cited Paper Journal of Cystic Fibrosis Award" – "Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice" (Journal of Cystic Fibrosis, 2008;7(3):179-196)

Награде

- Александра Дивац 2003 "ERS Silver Sponsorship" – European Respiratory Society 2003 Congress
- Валентина Ђорђевић 2003 "ISTH Developnig World Scientist Grant" – "XIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis"
- Драгана Стефановић 2004. награђени истраживач из области биологије према резултатима у 2002. години
- Валентина Ђорђевић 2004. награђени истраживач из области биологије према резултатима у 2002. години
- Марија Станковић 2005 "ERS Bronze Sponsorship" – 15th European Respiratory Society Annual Congress
- Мила Љујић 2006 "ERS Gold Sponsorship" – 16th European Respiratory Society Annual Congress
- Мила Љујић 2006 FEBS travel and participation grant – International Free Radical Summer School: Biomarkers of oxidative stress and responses, Spetses Island, Greece
- Марија Станковић 2006 FEBS participation grant – International Free Radical Summer School: Biomarkers of oxidative stress and responses, Spetses Island, Greece
- Марија Станковић 2007 "ERS Silver Sponsorship" – 17th European Respiratory Society Annual Congress
- Марија Станковић 2007 Participation grant - 9th International Meeting Human Genome Variation and Complex Genome Analysis
- Валентина Ђорђевић 2007 "ISTH Developnig World Scientist Grant" – "XXI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis"
- Александра Николић 2007 "Developing Nations Travel Grant" – 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
- Александра Николић, Александра Дивац, Мила Љујић 2008. треће место у области биологија на Такмичењу за најбољу технолошку иновацију у Србији у категорији „Потенцијали“
- Сандра Вранић 2008. друга награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи дипломски рад из области молекуларне биологије одбраћен у 2007. години
- Александра Дивац 2008 "Young Scientist Award" – "First Eastern European CF Conference: 'What's New in the Diagnosis, Treatment and Prevention of Cystic Fibrosis?'"
- Драгица Радојковић 2008 "Top 10 Cited Paper Journal of Cystic Fibrosis Award" – "Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice" (Journal of Cystic Fibrosis, 2008;7(3):179-196)



- Марија Станковић 2008 “EuroCareCF Travel Grant” – студијски боравак у Лисабону, Португал
- Марија Станковић 2008 “Fellowship for European Human Genetics Conference 2008”
- Мила Љујић, Александра Несторовић 2008 “Eurogentest Fellowship” – студијски боравак у Прагу, Република Чешка
- Александра Дивац 2009. награда Фондације „Горан Љубијанкић” за најбољи докторски рад из области молекуларне биологије одбраћен у 2008. години
- Мила Љујић 2009 “Fellowship for European Human Genetics Conference 2009”
- Валентина Ђорђевић 2009 “ISTH Developnig World Scientist Grant” – “XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis”

- Marija Stankovic 2008 “EuroCareCF Travel Grant” for short study visit in Lisbon, Portugal
- Marija Stankovic 2008 “Fellowship for European Human Genetics Conference 2008”
- Mila Ljubic, Aleksandra Nestorovic 2008 “Eurogentest fellowship” for short study visit in Prague, Czech Republic
- Aleksandra Divac 2009 award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best PhD thesis in molecular biology in 2008
- Mila Ljubic 2009 “Fellowship for European Human Genetics Conference 2009”
- Valentina Djordjevic 2009 “ISTH Developnig World Scientist Grant” – “XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis”



25
ГОДИНА - УСПЕХ

Лабораторија за хуману молекуларну генетику
Laboratory for Human Molecular Genetics



Laboratory for Human Molecular Genetics

Head: Milena Stevanović, PhD, Principal Research Fellow,
Corresponding member of Serbian Academy of Sciences and Arts

Research team:

Nataša Kovačević Grujičić, PhD
Marija Mojsin, PhD
Andrijana Klajn, PhD
Jelena Popović, PhD
Isidora Petrović, MSc
Danijela Drakulić, MSc
Aleksandar Krstić, MSc
Milena Milivojević, BSc
Jovana Jasnić Savović, BSc
Slobodan Davidović, BSc
Dijana Takić, BSc

Лабораторија за хуману молекуларну генетику

Руководилац: др Милена Стевановић, научни саветник,
дописни члан Српске академије наука и уметности

Истраживачки тим:

др Наташа Ковачевић Грујичић
др Марија Мојсин
др Андријана Клајн
др Јелена Поповић
мр Исидора Петровић
мр Данијела Дракулић
мр Александар Крстић
Милена Миливојевић
Јована Јаснић Савовић
Слободан Давидовић
Дијана Такић



Abstract

Since the beginning, the main research interest has been focused on studying human SOX genes. SOX genes encode transcription factors that play critical roles in cell fate determination, differentiation and proliferation in numerous developmental processes. In collaboration with Prof. Peter Goodfellow (University of Cambridge, United Kingdom) six novel members of the human SOX gene family were cloned and characterized, including SOX2, SOX3, SOX9, SOX14, SOX18 and SOX20 genes.

The subsequent research was focused on studying the molecular mechanisms underlying regulation of the human SOX genes expression. This research led to detection of various control elements and identification of numerous general and tissue-specific transcription factors involved in the regulation of the human SOX2, SOX3, SOX14 and SOX18 genes expression.

During nervous system development, SOX1, SOX2 and SOX3 transcription factors control many different processes, including maintenance of pluripotency, cell fate decision and terminal differentiation. Accordingly, one of the research goals is to study the roles of SOX2 and SOX3 genes in neural differentiation of NT2/D1 cells.

Recently, the research has been focused on the high-resolution phylogenetic studies of mtDNA variation in ancient populations that resided in the Southwestern region of Serbia from Bronze Age up to Middle Ages. The comparison of the variability between ancient and contemporary populations will provide an overview of the migration patterns which led to the colonization of the various geographic areas of Serbia.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) based diagnostics was developed for detection of microdeletion syndromes (DiGeorge and Prader-Willi / Angelman), rare mosaic karyotypes and complex structural chromosomal rearrangements.

Research focus

Cloning, studying the structure, regulation of expression and functions of SOX genes

Since established, the main research interest of the Laboratory for human molecular genetics has been focused on studying the human SOX genes. SOX genes encode transcription factors that play critical roles in cell fate determination, differentiation and proliferation in numerous developmental processes. SOX genes are divided into ten groups, and research is concentrated on the SOXB group family members (SOX2, SOX3, SOX14) that play major roles in neural development, as well as, on SOX18 gene having important role in regulation of angiogenesis.

Cloning and studying the structure of the human SOX genes

During the work in Prof. Peter Goodfellow's Laboratory at the University of Cambridge (United Kingdom) Dr. Milena Stevanović was involved in the research that resulted in the dis-

Апстракт

Од оснивања, основно истраживачко интересовање Лабораторије усмерено је на проучавање хуманих SOX гена. SOX гени кодирају транскрипционе факторе који током развића сисара имају важне улоге у одређивању судбине, диференцијацији и пролиферацији ћелија. У сарадњи са проф. Peter-ом Goodfellow-ом (University of Cambridge, United Kingdom) клонирано је и окарактерисано шест нових чланова ове мултигенске фамилије код човека (гени SOX2, SOX3, SOX9, SOX14, SOX18 и SOX20).

Након клонирања, одређивања структуре, хромозомске локације и експресије, настављена су истраживања посвећена проучавању механизма транскрипционе регулације експресије хуманих SOX гена. Ова истраживања довела су до дефинисања контролних региона и идентификације бројних општих и ткивно специфичних транскрипционих фактора укључених у регулацију експресије хуманих SOX2, SOX3, SOX14 и SOX18 гена.

Током развића нервног система SOX1, SOX2 и SOX3 транскрипциони фактори контролишу многобројне процесе, укључујући одржавање плурипотентности, одређивање судбине ћелија и терминалну диференцијацију. Због тога је један од циљева истраживања проучавање улоге SOX2 и SOX3 гена у процесима неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија.

Од недавно је отворен нови правац истраживања усмерен на филогенетску анализу варијација на нивоу митохондријалне ДНК у популацијама које су насељавале подручје југозападне Србије од бронзаног доба до средњег века. Поређење варијабилности код древних и савремених популација пружиће увид у процесе миграција који су довели до насељавања различитих географских подручја Србије.

Лабораторија за хуману молекуларну генетику једна је од ретких у нашој земљи која се годинама бави применом флуоресцентне *in situ* хибридизације (FISH) у дијагностици микроделеционих синдрома (DiGeorge и Prader-Willi/Angelman), детекцији хромозомског мозаицизма, као и у детекцији сложених реаранжмана хромозома који се не могу открити класичним методама цитогенетике.

Фокус истраживања

Клонирање, изучавање структуре, регулације експресије и функције хуманих SOX гена

Од оснивања, основни истраживачки интерес Лабораторије усмерен је на проучавање хуманих SOX гена. SOX гени кодирају транскрипционе факторе који током развића сисара имају важне улоге у одређивању судбине, диференцијацији и пролиферацији ћелија. SOX гени су подељени у десет група, а истраживања су обухватала рад на генима SOXB групе (SOX2, SOX3, SOX14), који имају важне улоге у развићу нервног система, и SOX18 гену који има улогу у регулацији процеса ангиогенезе.

Клонирање и проучавање структуре хуманих SOX гена

Током боравка у Лабораторији проф. Peter-a Goodfellow-a (University of Cambridge, United Kingdom) др Милена Стевановић била је у истраживачком тиму који је учествовао у

within the *SOX3* promoter region, while retinoid receptor RXR α was identified as a major mediator of retinoic acid induced *SOX3* gene up-regulation.

Additionally, the effects of signaling pathways on *SOX* genes expression have been investigated. It was demonstrated that Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway and their effectors (GLI1 and FOXA2) are involved in up-regulation of *SOX14* gene expression, while it is shown that *SOX18* gene expression is modulated by factors and drugs known to positively or negatively regulate angiogenesis.

Studying the roles of *SOX* genes in neural differentiation and angiogenesis

Recently, considerable attention has been focused on identification of molecular mechanisms responsible for maintaining neural progenitor or stem cell fate throughout ontogeny. During nervous system development, *SOX1*, *SOX2* and *SOX3* transcription factors control many different processes, including maintenance of pluripotency, cell fate decision and terminal differentiation. They continue to be expressed and to maintain neural progenitors in the adult brain, controlling adult neurogenesis.

Accordingly, one of the research goals has been to study the roles of *SOX2* and *SOX3* genes in neural differentiation using the human embryonal carcinoma NT2/D1 cells as a model system. NT2/D1 cells have the ability to differentiate along the neural lineage in the

Такође, проучавани су сигнални путеви који утичу на активност *SOX* гена. Тако је изучаван утицај SHH (Sonic Hedgehog) сигналног пута и његових ефектора (GLI и FOXA2) на експресију *SOX14* гена, а показано је и да је експресија *SOX18* гена модулирана факторима који позитивно или негативно регулишу ангиогенезу.

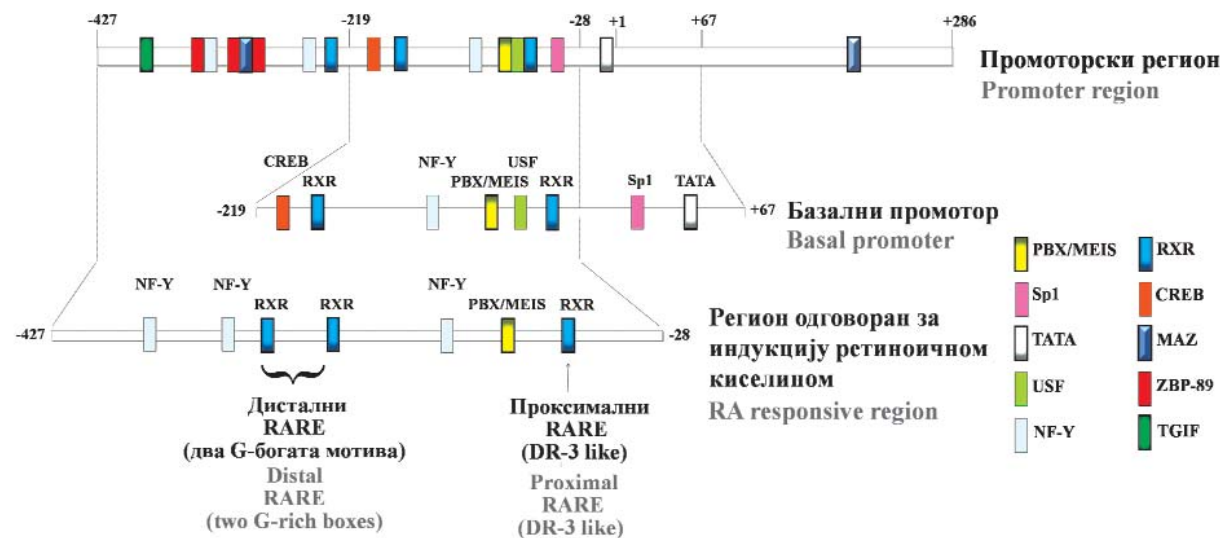
Проучавање улоге *SOX* гена у процесу неуралне диференцијације и ангиогенези

Од недавно, значајна пажња посвећена је идентификацији молекуларних механизма одговорних за одржавање неуралних прогенитора и судбине матичних ћелија током онтогенезе. Истраживања су показала да током развића нервног система *SOX1*, *SOX2* и *SOX3* транскрипциони фактори контролишу многобројне процесе, укључујући одржавање плурипотентности, одређивање судбине ћелија и терминалну диференцијацију. Експресија ових транскрипционих фактора детектована је и у адултном мозгу, где они одржавају популацију неуралних прогенитора и контролишу адултну неурогенезу.

Због тога је један од циљева истраживања био и проучавање улоге *SOX2* и *SOX3* гена у процесима неуралне диференцијације. Њихова улога проучавана је у модел-систему хумане ембрионалне карциномске ћелијске линије NT2/D1. Након индукције ретиноичном киселином, ове ћелије имају способност диференцијације у неуроне. Будући да NT2/D1 ћелије имају карактеристике сличне прогениторским ћелијама централног нервног система, оне представљају одличан *in vitro* модел-систем за изучавање хуманих гена који регулишу неуралну диференцијацију.

Проучавање улоге *SOX2* и *SOX3* гена

Идентификација транскрипционих фактора укључених у регулацију експресије хуманог *SOX3* гена Identification of transcription factors involved in the regulation of the human *SOX3* gene expression



Активација *SOX3* гена:
Sp1, USF, NF-Y, CREB, MAZ, RXR, PBX/MEIS
Up-regulation of *SOX3*:
Sp1, USF, NF-Y, CREB, MAZ, RXR, PBX/MEIS

Репресија *SOX3* гена:
ZBP-89, TGIF
Down-regulation of *SOX3*:
ZBP-89, TGIF

Индукција *SOX3* гена ретиноичном киселином:
RXR, PBX/MEIS, NF-Y
RA-inducibility of *SOX3*:
RXR, PBX/MEIS, NF-Y



у процесу неуралне диференцијације засновано је на анализи ефеката промена у експресији ових гена на одређивање судбине и диференцијацију NT2/D1 ћелија. За изучавање ефеката повећане експресије генерисани су ћелијски клонови који експримирају SOX2 и SOX3 гене, применом конститутивног и доксициклином индуцибилног експресионог система. Нарушавање функције SOX2 и SOX3 гена у NT2/D1 ћелијама обухватиће генерисање ћелијских клонова који експримирају доминантно негативне форме ових протеина.

Ефекат измењене експресије SOX2 и SOX3 гена на неуралну диференцијацију NT2/D1 ћелија биће праћен анализом експресије маркера плурипотентности (Oct4, Nanog, SOX2, REST) као и маркера три фазе неуралне диференцијације (фаза појаве неуралних прогенитора; фаза изласка одређених прогенитора из ћелијског циклуса; фаза терминално диференцираних неурона). Такође, планирана је трансплантација добијених ћелијских клонова у имуно-дефицијентне мишеве ради праћења формирања тератома тумора, будући да је тератома есеј индикатор плурипотентности ћелија.

Ова истраживања омогућиће идентификацију молекуларних сигнала укључених у регулацију експресије SOX2 и SOX3 гена, што ће допринети бољем разумевању улоге ових гена у одржавању плурипотентности неуралних прогенитора, одређивању судбине ћелија и процесу неуралне диференцијације.

Транскрипциони фактор SOX18 има значајну улогу у специјализацији ендотелијалних ћелија, диференцијацији, нормалној и туморској ангиогенези. Овај транскрипциони фактор окарактерисан је и као потенцијални таргет у туморској антиангиогеној терапији. Истраживања су усмерена на идентификацију мреже транскрипционих регулатора који контролишу експресију SOX18 гена, као и на проучавање улоге овог транскрипционог фактора у нормалној и туморској ангиогенези. Ова истраживања допринеће развоју нових терапијских стратегија за фармаколошку манипулацију ангиогенезе.

Молекуларно-генетичка анализа ДНК у популацијама које су насељавале подручје југозападне Србије у периоду од бронзаног доба до средњег века

Недавно је отворен нови правац истраживања усмерен на филогенетску анализу варијација на нивоу митохондријалне ДНК у популацијама које су насељавале подручје југозападне Србије (Чачак–Краљево–Прибој) од бронзаног доба до средњег века (1800 год. п.н.е. –1250 год. н.е.).

Анализа географске дистрибуције и диверзитета генетичких варијација („филогеографски приступ“) пружа могућност изучавања степена експанзије, миграција и других облика генског протока током праисторије. Већина филогенетских анализа заснива се на анализи митохондријалне ДНК (мтДНК) и заснована је на проучавању варијација у секвенци првог хиперваријабилног сегмента (HVS-I) контролног региона мтДНК. Полиморфизми појединачних нуклеотида (SNPs), присутни у митохондријалном геному и Y хромозому, због одсуства рекомбинација наслеђују се као хаплоблокови. Због ове особине, као и унипа-

presence of retinoic acid. Since the properties of these cells are similar to those of progenitor cells in the CNS, they provide an excellent *in vitro* model system for studying human genes that promote and regulate neural differentiation.

Investigation of the roles of SOX2 and SOX3 genes in neural differentiation is based on studying the effects of modulation of their expression on certain features of NT2/D1 cells, such as ability to proliferate, differentiate into neurons and form teratomas. For gain-of-function studies, cell clones are generated that stably overexpress SOX2 and SOX3 genes by applying both, constitutive and doxycycline inducible expression systems. For loss-of-function studies, cell clones will be generated which express dominant negative forms of SOX2 and SOX3 proteins. Differentiation potential of cell clones will be studied by expression analysis of pluripotent stem cells markers (Oct4, Nanog, SOX2, REST) and some of the markers specific for three sequential phases of NT2/D1 neural differentiation (appearance of neuroprogenitors; cell cycle exit of committed precursors; terminally differentiated neurons). Finally, NT2/D1 cell clones with modulated SOX2 and SOX3 genes expression will be transplanted into immuno-deficient mice to test if they have the ability to form teratomas, since the teratoma assay is the indicator of cells pluripotency.

This line of research will enable identification of signaling networks that are involved in the regulation of SOX2 and SOX3 genes expression and will contribute to the better understanding of the roles of these genes in maintenance of neural progenitor, cell fate determination and neural differentiation.

Transcription factor SOX18 plays important role in endothelial cell specification, differentiation, normal and tumor angiogenesis. Importantly, this gene has already been marked as a potential target in tumor anti-angiogenic therapy. The ongoing research will help in the identification of the regulatory network that control SOX18 gene expression and will give additional insight into the role of this gene in angiogenesis. It could provide the basis for development of the novel therapeutic strategies aimed at pharmacological manipulation of angiogenesis.

Molecular genetic analysis of the populations residing in the Southwestern region of Serbia from Bronze Age up to Middle Ages

Recently, the novel line of research has been focused on the high-resolution phylogenetic studies of mtDNA and Y chromosome variation in ancient populations that resided in the Southwestern region of Serbia (Čačak–Kraljevo–Priboj) from Bronze Age (1800 BC) up to Middle Ages (1250 AD).

The study of the geographic distribution and diversity of genetic variation, known as the “phylogeographic approach”, is providing a useful tool for the investigation of range expansions, migrations, and other forms of gene flow during prehistory. Most of the phylogenetic analyses have been based on sequence variation within the first hypervariable segment (HVS-I) of the control region of mtDNA. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located

within the mitochondrial genome and in non-recombinant part of the Y chromosome are particularly valuable because they have uniparental mode of inheritance (paternal and maternal, respectively) and do not recombine, so they are inherited as haplotype blocks. Comparison of the variability between ancient and contemporary populations will provide an overview of the migration patterns which led to the colonization of the various geographic areas of Serbia.

As a result of post-mortem damage, ancient DNA molecules are often highly fragmented and usually found in low concentrations. Because of the high risk of contamination with modern DNA, work with ancient DNA will be performed under special conditions with strict implementation of corresponding laboratory protocols.

Application of Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) for detection of numerical and structural chromosome aberrations

To bridge the gap between basic research and its application, Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) (initially introduced for SOX genes mapping) was successfully applied for prenatal and postnatal detection of chromosome aberrations.

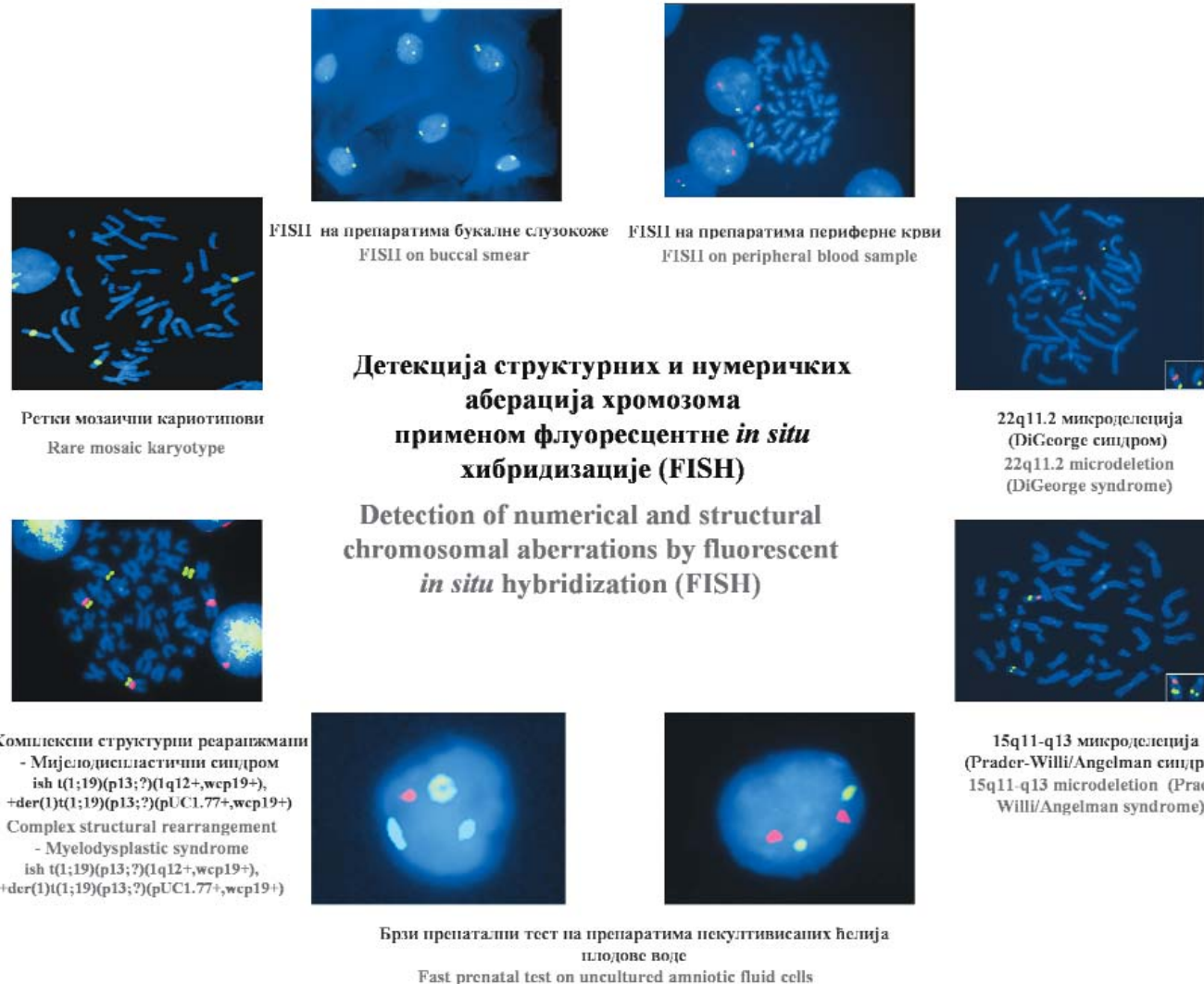
The Laboratory for human molecular genetics was the first one in Serbia that developed FISH based diagnostics of mi-

реналног наслеђивања (матернално, односно патернално наслеђивање), анализа ових полиморфизама биће примењена у филогенетским анализама. Поређење варијабилности код древних и савремених популација пружиће увид у процесе миграција који су током историје довели до колонизације различитих географских подручја Србије.

Као резултат различитих врста оштећења, древна ДНК је често деградована и присутна је у веома малој количини у археолошким узорцима који су доступни за анализу. Због велике вероватноће контаминације модерном ДНК, рад на древном ДНК материјалу одвија се у специјалним лабораторијским условима, уз стриктну примену одговарајућих лабораторијских протокола.

Примена флуоресцентне *in situ* хибридације (FISH) у детекцији нумеричких и структурних абериција хромозома

Знање и искуство стечено у основним истраживањима успешно су примењени у молекуларној дијагностици. Тако је техника флуоресцентне *in situ* хибридације (FISH), првобитно уведена ради мапирања хуманих гена, успешно примењена за детекцију структурних и нумеричких абериција хромозома. Тако су основна истраживања из области молекуларне генетике нашла своју непосредну примену у медицинској дијагностици кроз сарадњу са бројним кли-





никама у земљи.

Лабораторија за хуману молекуларну генетику једна је од првих у нашој земљи која је применила FISH у дијагностици микроделеционих синдрома (DiGeorge и Prader-Willi/Angelman), детекцији хромозомског мозаицизма, као и у детекцији сложених реаранжмана хромозома који се не могу детектовати класичним методама цитогенетике.

Примена генетичких маркера у селекцији особина од економског значаја код домаћих животиња

Техника ланчаног умножавања ДНК (PCR) и полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената (RFLP) примењени су за одређивање генетичких варијанти протеина млека и селекцију пожељних варијанти κ -казеина и β -лактоглобулина, које утичу на прерађивачке особине млека.

У области ветерине развијена је молекуларна дијагностика BLAD-а (адхезиона дефицијенција леукоцита говеда) и стресног синдрома свиња.

Одабране публикације

1. Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow P N. (1993) SOX3 is an X-linked gene related to SRY. Hum. Mol. Genet. 2, 2013-2018.
2. Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P. (1994) The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. Mamm. Genome. 5, 640-642.
3. Foster J W, Dominguez-Steglich M A, Guioli S, Kwok C, Weller P A, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I D, Goodfellow P N, et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. Nature. 372, 525-530.
4. Vujic M, Rajic T, Goodfellow P N, Stevanovic M. (1998) cDNA characterization and high resolution mapping of the human SOX20 gene. Mamm. Genome. 9, 1059-1061.
5. Arsic N, Rajic T, Stanojcic S, Goodfellow P N, Stevanovic M. (1998) Characterization and mapping of the human SOX14 gene. Cytogenet. Cell Genet. 83, 139-146.
6. Stanojcic S, Stevanovic M. (2000) The human SOX18 gene: cDNA cloning and high resolution mapping. Biochim. Biophys. Acta. 1492, 237-241.
7. Kovacevic Grujicic N, Mojsin M, Krstic A, Stevanovic M. (2005) Functional characterization of the human SOX3 promoter: identification of transcription factors implicated in basal promoter activity. Gene. 344, 287-297.
8. Nikcevic G, Savic T, Kovacevic-Grujicic N, Stevanovic M. (2008) Up-regulation of the SOX3 gene expression by retinoic acid: characterization of the novel promoter-response element and the retinoid receptors involved. J. Neurochem. 107, 1206-1215.
9. Petrovic I, Nikcevic G, Zaric J, Ruegg C, Stevanovic M. (2010) VEGF and TNF up-regulate, NSAID down-regulate SOX18 protein level in HUVEC. Cent. Eur. J Biol. 5, 427-434.
10. Popovic J, Klajn A, Petrovic I, Stevanovic M. (2010) Tissue-specific Forkhead protein FOXA2 up-

crodeletion syndromes (DiGeorge and Prader-Willi/Angelman), as well as detection of rare mosaic karyotypes and complex structural chromosomal rearrangements that could not be analyzed by classical cytogenetic analysis.

Marker assisted selection for the economic trait loci in cattle

PCR and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) have been used for genotyping milk protein variants. Accurate genotyping of κ -casein and β -lactoglobulin and selection of desirable genotypes have economic significance, since their genetic variants have effects on milk production traits.

Additionally, molecular diagnostics of BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) and porcine stress syndrome have been developed in the Laboratory for human molecular genetics.

Selected publications

1. Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow P N. (1993) SOX3 is an X-linked gene related to SRY. Hum. Mol. Genet. 2, 2013-2018.
2. Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P. (1994) The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. Mamm. Genome. 5, 640-642.
3. Foster J W, Dominguez-Steglich M A, Guioli S, Kwok C, Weller P A, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I D, Goodfellow P N, et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. Nature. 372, 525-530.
4. Vujic M, Rajic T, Goodfellow P N, Stevanovic M. (1998) cDNA characterization and high resolution mapping of the human SOX20 gene. Mamm. Genome. 9, 1059-1061.
5. Arsic N, Rajic T, Stanojcic S, Goodfellow P N, Stevanovic M. (1998) Characterization and mapping of the human SOX14 gene. Cytogenet. Cell Genet. 83, 139-146.
6. Stanojcic S, Stevanovic M. (2000) The human SOX18 gene: cDNA cloning and high resolution mapping. Biochim. Biophys. Acta. 1492, 237-241.
7. Kovacevic Grujicic N, Mojsin M, Krstic A, Stevanovic M. (2005) Functional characterization of the human SOX3 promoter: identification of transcription factors implicated in basal promoter activity. Gene. 344, 287-297.
8. Nikcevic G, Savic T, Kovacevic-Grujicic N, Stevanovic M. (2008) Up-regulation of the SOX3 gene expression by retinoic acid: characterization of the novel promoter-response element and the retinoid receptors involved. J. Neurochem. 107, 1206-1215.
9. Petrovic I, Nikcevic G, Zaric J, Ruegg C, Stevanovic M. (2010) VEGF and TNF up-regulate, NSAID down-regulate SOX18 protein level in HUVEC. Cent. Eur. J Biol. 5, 427-434.
10. Popovic J, Klajn A, Petrovic I, Stevanovic M. (2010) Tissue-specific Forkhead protein FOXA2 up-regulates SOX14 gene expression. Biochim. Biophys. Acta.- Gene Regul. Mech. 1799, 411-418.



Projects

- Studying signal transduction pathways and epigenetic mechanisms that control human SOX genes expression: further insight into their roles in cell fate determination and differentiation (project No.: 173051). Ministry of Science and Technological Development, Republic Serbia, 2011–2014
- Ethnogenesis of the Serbs during the Middle Ages (until c.1250): a comparative analysis of the historic-cultural heritage, genetic material and artifacts of material culture from the aspect of analytical chemistry (project No.: 47025). Subproject: Molecular genetic analysis of the populations residing in the Southwestern region of the Serbia from Bronze Age up to Middle Ages. Ministry of Science and Technological Development, Republic Serbia, 2011–2014
- Studying the molecular mechanisms involved in maintaining pluripotency and differentiation of stem cells (No.: Ф-24). Serbian Academy of Sciences and Arts, 2010
- Studying the regulation of expression and function of the human SOX genes (project No.: 143028). Ministry of Science and Environmental Protection, Republic Serbia, 2006–2010
- Human SOX genes: Studying the structure and regulation of expression (project No.: 1438). Ministry of Science, Technologies and Development, Republic Serbia, 2002–2005
- Application of molecular techniques in analysis of economic trait loci in cattle (project No.: S.4.27.48.0001). Ministry of Science and Technology, Republic Serbia, 1998–2000
- FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) in fundamental and clinical investigation (project No.: I.3.1429). Ministry of Science and Technology, Republic Serbia, 1997–1998
- Cloning and characterization of human SOX genes (project No.: 03E11). Ministry of Science and Technology, Republic Serbia, 1996–2000
- Regulation of human SOX18 gene expression and its role in angiogenesis (project No.: CRP/YUG07-01). The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Italy, 2008–2010
- Retinoic induction of SOX3 gene expression (project No.: CRP/YUG99-01). The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Italy, 2000–2002
- SOX3 activation by retinoic acid (project No.: 18876GCS-B09). Wellcome Trust, United Kingdom, 1995–1997
- SOX genes: A new family of genes related to the sex determining gene SRY (project No.: 037356/Z/92). Wellcome Trust, United Kingdom, 1992–1993

Awards

- Jelena Popović, Annual award of the "Goran Ljubijankić" Foundation for the best PhD thesis in the field of molecular biology defended in 2010
- Slobodan Davidović, Annual award of the "Goran Ljubijankić" Foundation for the best BSc thesis in the field of molecular biology defended in 2010

regulates SOX14 gene expression. Biochim. Biophys. Acta.- Gene Regul. Mech. 1799, 411-418.

Пројекти

- Проучавање сигналних путева и епигенетичких механизма укључених у контролу експресије хуманих SOX гена: даље расветљавање њихове улоге у одређивању судбине и диференцијације ћелија (основна истраживања, бр.: 173051). Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2011–2014
- Етногенеза Срба у Средњем веку: упоредна анализа историјско-културног наслеђа, генетичког материјала и предмета материјалне културе са аспекта аналитичке хемије (пројекат интегралних и интердисциплинарних истраживања, бр.: 47025). Потпројекат: Молекуларно генетичка анализа ДНК у популацијама које су насељавале подручје југозападне Србије у периоду од бронзаног доба до средњег века. Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2011–2014
- Проучавање молекуларних механизма укључених у одржавање плурипотентности и диференцијације матичних ћелија (бр.: Ф-24). Фонд за научна истраживања Српске академије наука и уметности, 2010
- Regulation of human SOX18 gene expression and its role in angiogenesis (страни пројекат, бр.: CRP/YUG07-01). The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), 2008–2010
- Изучавање регулације експресије и функције хуманих SOX гена (основна истраживања, бр.: 143028). Министарство за науку и заштиту животне средине Републике Србије, 2006–2010
- Хумани SOX гени: проучавање структуре и регулације експресије (основна истраживања, бр.: 1438). Министарство за науку, технологије и развој Републике Србије, 2002–2005
- Retinoic acid induction of SOX3 gene expression (страни пројекат, бр.: CRP/YUG99-01). The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Italy, 2001–2003
- Развој и примена нових биотехнолошких метода и поступака за повећање производње и побољшање квалитета меса, млека и јаја (стратешки пројекат, бр.: S.4.27.48.0001, PP4). Потпројекат: Увођење молекуларно биолошких поступака у генетичкој анализи особина од економског значаја код домаћих животиња. Министарство за науку и технологију Републике Србије, 1998–2000
- FISH- Флуоресцентна *in situ* хибридизација и њена примена у пренаталној дијагностици, детектовању наследних болести и малигној трансформацији (иновациони пројекат, бр.: I.3.1429). Министарство за науку и технологију Републике Србије, 1997–1998
- Клонирање и карактеризација хуманих SOX гена (основна истраживања, бр.: 03E11). Министарство за науку и технологију Републике Србије, 1996–2000
- SOX3 activation by retinoic acid (страни пројекат бр.: 18876GCS-B09). The Wellcome Trust, UK, 1995–1997



- SOX genes: A new family of genes related to the sex determining gene SRY (страни пројекат бр.: 037356/Z/92). The Wellcome Trust, UK, 1992–1993

Награде

- Јелена Поповић, годишња награда Фондације „Горан Љубијанкић” за најбољу докторску дисертацију из области молекуларне биологије одбрањену у 2010. години
- Слободан Давидовић, годишња награда Фондације „Горан Љубијанкић” за најбољи дипломски рад из области молекуларне биологије одбрањен у 2010. години
- Наташа Ковачевић Грујичић, годишња награда Фондације „Горан Љубијанкић” за најбољу докторску дисертацију из области молекуларне биологије одбрањену у 2009. години
- Марија Мојсин, годишња награда Фондације „Горан Љубијанкић” за најбољу докторску дисертацију из области молекуларне биологије одбрањену у 2008. години
- Александар Крстић, годишња награда Фондације „Горан Љубијанкић” за најбољи магистарски рад из области молекуларне биологије одбрањен у 2006. години
- Исидора Петровић, годишња награда Фондације „Горан Љубијанкић” за најбољи магистарски рад из области молекуларне биологије одбрањен у 2005. години
- Димитрије Крстић, годишња награда Фондације „Горан Љубијанкић” за најбољи дипломски рад из области молекуларне биологије одбрањен у 2004. години
- Милена Стевановић, награда Министарства за науку и заштиту животне средине за најуспешније истраживаче из области биологије – категорија А1, 2004
- Данијела Дракулић, награда Министарства за науку и заштиту животне средине за најуспешније истраживаче из области биологије – категорија А3, 2004
- Наташа Ковачевић Грујичић, награда Министарства за науку и заштиту животне средине за најуспешније истраживаче из области биологије – категорија А3, 2004

- Nataša Kovačević Grujičić, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best PhD thesis in the field of molecular biology defended in 2009
- Marija Mojsin, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best PhD thesis in the field of molecular biology defended in 2008
- Aleksandar Krstić, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best MSc thesis in the field of molecular biology defended in 2006
- Isidora Petrović, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best MSc thesis in the field of molecular biology defended in 2005
- Dimitrije Krstić, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best BSc thesis in the field of molecular biology defended in 2004
- Milena Stevanović, First award for the most successful researchers in the field of biology, Ministry of Science and Environmental Protection, Republic of Serbia, 2004
- Danijela Drakulić, Third award for the most successful researchers in the field of biology, Ministry of Science and Environmental Protection, Republic of Serbia, 2004
- Nataša Kovačević Grujičić, Third award for the most successful researchers in the field of biology, Ministry of Science and Environmental Protection, Republic of Serbia, 2004



25
години - успех

Лабораторија за молекуларну генетику и екологију микроорганизама
Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology



Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology

Head: Branka Vasiljević, PhD, Principal Research Fellow

Associates:

Ivana Morić, PhD
Jasmina Nikodinović Runić, PhD
Tatjana Ilić Tomić, PhD
Lidija Đokić, PhD
Lidija Šenerović, PhD
Sandra Vojnović, MSc
Nada Stanković, MSc
Tanja Narančić, BSc
Sanja Bajkić, BSc
Aleksandar Pavić, BSc

Лабораторија за молекуларну генетику и екологију микроорганизама

Руководилац: др Бранка Васиљевић, научни саветник

Сарадници:

др Ивана Морић
др Јасмина Никодиновић Рунић
др Татјана Илић Томић
др Лидија Ђокић
др Лидија Шенеровић
мр Сандра Војновић
мр Нада Станковић
Тања Наранчић
Сања Бајкић
Александар Павић



Abstract

Since it has been founded in 1998 Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology has gradually been broadening its research interest - from fundamental to more applicative research. At the beginning, research focus was molecular genetics of actinomycetes, aminoglycosides producing bacteria, with the especial interest in a) mechanisms of resistance to their own toxic products through methylation of antibiotic target and b) regulation of resistance gene expression. As interest in clean technologies and preservation of biodiversity has been growing, our Laboratory goals are widen to search for novel microorganisms, metabolites, and genes from different environmental samples. Recent Laboratory projects are oriented towards bioprospecting for beneficial microorganisms, interesting enzymes and metabolites with potential application in bioremediation and biotechnology.

Research focus

Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology (previously Laboratory for Molecular Genetics of Actinomycetes) became independent research unit in 1998. In years prior to 1998 Laboratory members were engaged in "Molecular Genetics of Micromonospora", part of "Structure and Function of Genes of Industrial Microorganisms" project.

Initially, research focus of the Laboratory was molecular genetics of actinomycetes, producers of secondary metabolites, but as Laboratory grew its interest has broaden to molecular genetics of other environmental bacteria, especially of beneficial microorganisms, and microbial diversity.

The actinomycetes are ubiquitous in nature and mostly studied for their economical impact. They produce secondary metabolites that have antibiotic, antifungal, antitumor, immunosuppressive, enzyme inhibitory, insecticidal, herbicidal properties.

One of the first aims was to develop methods towards genetic engineering of *Micromonospora* (genus of *Actinomycetes*). In our Laboratory the method for transformation of *Micromonospora melanosporea* protoplasts has been developed. It has been shown that this organism produces a rare restriction enzyme recognizing more than six DNA nucleotides. During 90s, we have isolated and characterized pMZ1 plasmid from *Micromonospora zionensis*. It was determined that this plasmid was replicating *via* rolling circle replication (RCR) and that it was conjugable. This plasmid could also successfully integrate into the bacterial chromosome.

Since antibiotic producing bacteria are exposed to their own secondary metabolite(s) in order to survive they have to protect themselves from their products' toxicity. We have found very tempting to elucidate the molecular mechanisms of resistance in aminoglycoside producing strains and our research in this field started with cloning the *sgm* gene from *Mi-*

Апстракт

Од оснивања 1998. године, Лабораторија за молекуларну генетику и екологију микроорганизама постепено је проширивала своје истраживачко интересовање од фундаменталних ка применљивим истраживањима. Првобитно су истраживања била усмерена ка молекуларној генетици актиномицета, бактерија које производе аминогликозидне антибиотике, а посебна пажња била је усмерена ка проучавању а) механизма резистенције на сопствене токсичне продукте метилацијом места деловања антибиотика и б) регулације експресије гена одговорних за резистенцију на антибиотике. Како интересовање за чисте технологије и очување биолошког диверзитета непрестано расте, циљеви Лабораторије проширени су на тражење нових микроорганизама, метаболита и гена из различитих срединских узорака. Актуелни пројекти Лабораторије оријентисани су на тражење корисних микроорганизама, интересантних ензима и метаболита са потенцијалном применом у биолошком опоравку и биотехнологији.

Фокус истраживања

Лабораторија за молекуларну генетику и екологију микроорганизама (ранији назив Лабораторија за молекуларну генетику актиномицета) постала је независна истраживачка јединица 1998. године. У периоду пре 1998. чланови Лабораторије били су ангажовани на потпројекту „Молекуларна генетика микромоноспора“ у оквиру пројекта „Структура и функција гена индустријских микроорганизама“. Првобитни истраживачки интерес Лабораторије била је молекуларна генетика актиномицета, бактерија произвођача секундарних метаболита. Међутим, како се Лабораторија развијала тако се и њено истраживачко интересовање проширило на молекуларну генетику других срединских микроорганизама, посебно корисних бактерија, и изучавање микробиолошког диверзитета.

Актиномиците су широко распрострањене у природи и предмет су бројних истраживања пре свега због свог економског значаја. Ови микроорганизми производе секундарне метаболите као што су антибиотици, фунгициди, имуносупресори, инхибитори ензима, пестициди (хербициди, инсектициди). Један од првих задатака Лабораторије био је развој метода за манипулацију генетичким материјалом рода *Micromonospora* (фамилија *Actinomycetes*). У нашој лабораторији развијена је метода трансформације протопласта *Micromonospora melanosporea*. Такође смо утврдили да ова бактерија производи редак рестрикциони ензим који препознаје више од шест нуклеотида на ДНК. Током деведесетих година прошлог века рађено је и на плазмиду pMZ1 изолованом из бактерије *Micromonospora zionensis*. Показано је да се репликација плаزمида pMZ1 одвија механизмом котрљајућег обруча (RCR – rolling circle replication), а такође је показано да је овај плазмид коњугабилан и да се може интегрисати у бактеријски хромозом.

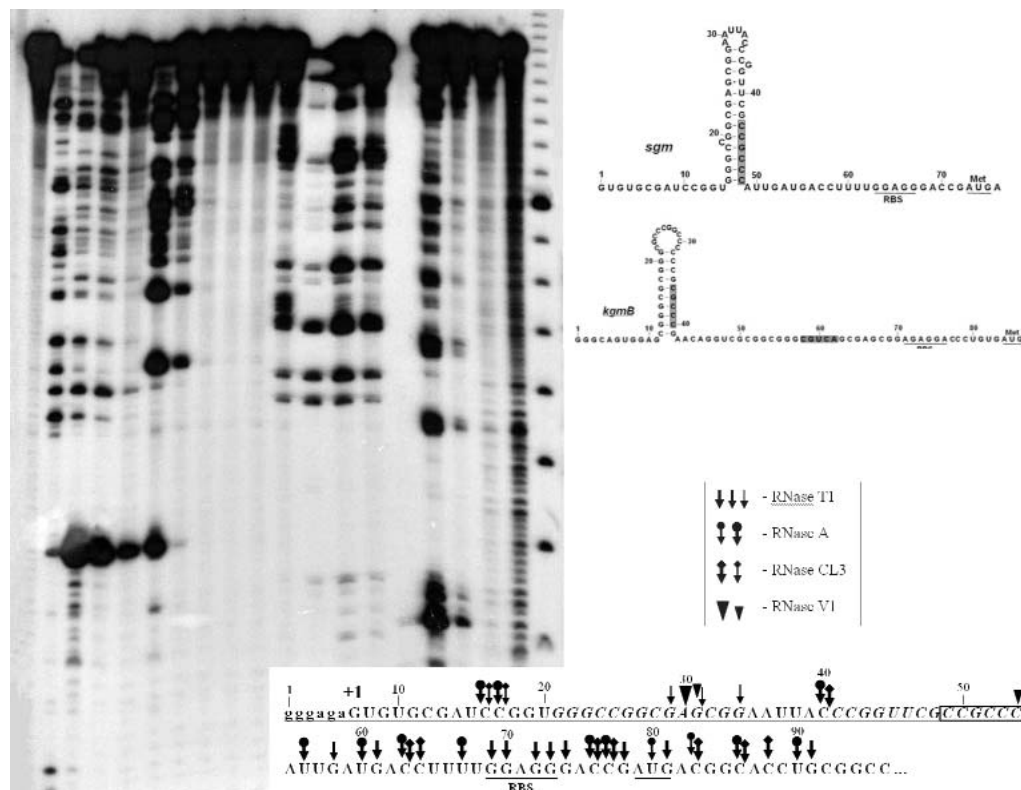
Како су бактерије које производе антибиотике и саме изложене дејству сопствених секундарних метаболита, оне морају, да би преживеле, да се заштите од њихове токсичности. Расветљавање механизма резистенције код бактерија које производе аминогликозиде започето је



клонирањем *sgm* гена из *Micromonospora zionensis*, произвођача аминогликозидног антибиотика G-52. Утврдили смо да *sgm* ген кодира 16S рРНК метилтрансферазу која, метилујући место деловања аминогликозида, тј. А место у малој рибозомалној субјединици, обезбеђује резистенцију свом носиоцу. Даља изучавања механизма регулације *sgm* гена утврдила су да је његова експресија регулисана са два промотора на транскрипционом нивоу, а да је овај ген додатно регулисан и на транслационом нивоу механизмом негативне ауторегулације. На основу свих резултата, предложили смо модел негативне ауторегулације који је укључивао интерференцију метилтрансферазе и иницијације транслације. Истовремено смо се бавили и проучавањем регулације експресије *grmA* гена из *M. purpurea* која производи гентамицински комплекс, као и регулацијом експресије *kgmB* гена из *Streptomyces tenebrarius*, произвођача небрамицинског комплекса. Експресија *kgmB* гена регулисана је механизмом негативне ауторегулација, баш као и експресија *sgm* гена, наспрот *grmA* гену који овом механизму не подлеже, иако постоји висок степен идентичности између GrmA и Sgm, односно KgmB на аминокиселинском нивоу. Према нашој хипотези, гени за резистенцију који подлежу механизму ауторегулације на транслационом нивоу у свом 5' нетранслирајућем региону (UTR) имају регулаторне примарне и/или секундарне структуре. На основу компјутерске анализе претпостављено је постојање секундарне структуре типа укоснице у 5' UTR *sgm* и *kgmB* иРНК молекула, са потенцијалним регулаторним функцијама. У RNase есејима потврђено је присуство претпостављене секундарне структуре у *sgm* 5' UTR иРНК, док таква структура није детектована у *kgmB* 5' UTR иРНК, иако је *in silico* анализа предвидела њено постојање.

По експресији *sgm*, *kgmB* односно *grmA* гена у *M. melanosporea*, уочен је интересантан феномен – рекомбиновани сојеви су испољавали, поред очекиване резистенције на 4,6-дисупституисане аминогликозиде, и резистенцију на хигромицин Б. Резистенција на хигромицин Б, која пре ових експеримената није била повезивана са овим рРНК метилтрансферазама, указала је на уникатност структуре рибозома код микромоноспора.

Мали број директних доказа о месту модификације већине 16S рРНК метилтрансфераза из



cromonospora zionensis, the producer of G-52 aminoglycoside antibiotic. It was shown that the *sgm* gene codes for 16S rRNA methyltransferase that methylates aminoglycoside's target, i.e. the A-site within small ribosomal subunit, and is responsible for the resistance. Further study of the mechanism of the *sgm* gene regulation revealed that the *sgm* gene expression was regulated by two promoters at transcriptional level, and additionally, at translational level, through mechanism of negative autoregulation. We have proposed a model for negative autoregulation at translational level that involves interference between methyltransferase and initiation of translation. In addition, we have studied the regulation of resistance gene expression mechanism of the *grmA* gene from *M. purpurea*, the producer of gentamicin complex and *kgmB* from *Streptomyces tenebrarius* that produces nebramycin complex. The *kgmB* gene expression undergoes negative autoregulation, similarly to the *sgm* gene, while the *grmA* gene regulation does not follow that pattern, despite high identity of GrmA to Sgm and KgmB at amino acid level. According to our hypothesis, resistance genes that are autoregulated at translational level in their 5' untranslated regions (UTR) contain regulatory sequences and/or secondary structures. Predictive secondary structure analysis implicated a presence of hairpin loop(s) in 5' UTR of *sgm* and *kgmB* mRNAs with potentially regulatory function. While the presence of predicted secondary structure in RNase experiments was confirmed in *sgm* mRNA 5' UTR, the structure hasn't be detected in 5' UTR mRNA of *kgmB*, although predicted.

Interestingly, upon expression of *sgm*, *kgmB* or *grmA* in *M. melanosporea*, recombinant strains acquired resistance to hygromycin B in addition to 4,6-disubstituted aminoglycosides resistance. Resistance to hygromycin B, not previously associated to these rRNA methyltransferases, revealed a uniqueness of micromonospora ribosome structure.

Very little direct evidence existed for target site modification for majority of 16S rRNA methyltransferases from aminoglycoside producers prior to our collaboration with Dr Gaeme L. Conn Laboratory from Manchester University, UK (WellcomeTrust Project). To-

gether we determined the site of action for Sgm, GrmA and Krm methyltransferases, which is G1405 position at A-site of 16S rRNA. We also determined two domain structure (C- and N- terminus), amino acid residues responsible for cofactor binding and catalytic activity of Sgm methyltransferase. Amino acid residues at C-terminus domain form Rossmann fold characteristic for all 16S rRNA methyltransferases. Mutational analysis revealed that G135, D156 and D182 amino acid residues form cofactor binding site while K199, E205, R236 and E267 amino acid residues have a role in methyl group transfer to 30S subunit.

In addition to studying molecular mechanisms of resistance to aminoglycosides, we have started to make collection of the soil isolates of actinomycetes from the various samples. Bacteria were screened for the production of antimicrobial and antifungal secondary metabolites.

We have also developed screening assay for the immunosuppressors using yeast platform. Strain *Saccharomyces cerevisiae* FAV20 was obtained by inactivation of VMA22 gene which is involved in normal vacuolar acidification and morphology. This strain was sensitive to FK506 which is known macrolide with immunosuppressive activity. We have also developed a set of degenerative PCR primers to amplify polyketide synthase type I (PKS I) sequence, in order to be used in the screening of the isolates. Using this approach, we have isolated and characterized soil strain

MS405, which turned to be a novel bacterial species. This isolate was annotated as *Streptomyces durmitorensis* sp. nov. using standard molecular taxonomy methods. We have made genome cosmid library of this strain and the sequencing of the PKS I cluster is under way. In collaboration with the Institute for Microbiology of the Czech Academy of Sciences, it has been elucidated that *Streptomyces durmitorensis* sp. nov. is producing new family of polyene macrolides with the main representative being 32,33-didehydroflamycin (DDHR).

The study of microbial diversity started with exploring the rhizospheres of two endomycorrhizal plants, *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*, that were shown to extrude up to three times more phenol and phenolics into the soil, in comparison to other higher plants. Metagenomic approach in studying the microbial communities of these rhizospheres was used. Fluorescent "in situ" hybridization (FISH) and DAPI staining revealed that there was only about

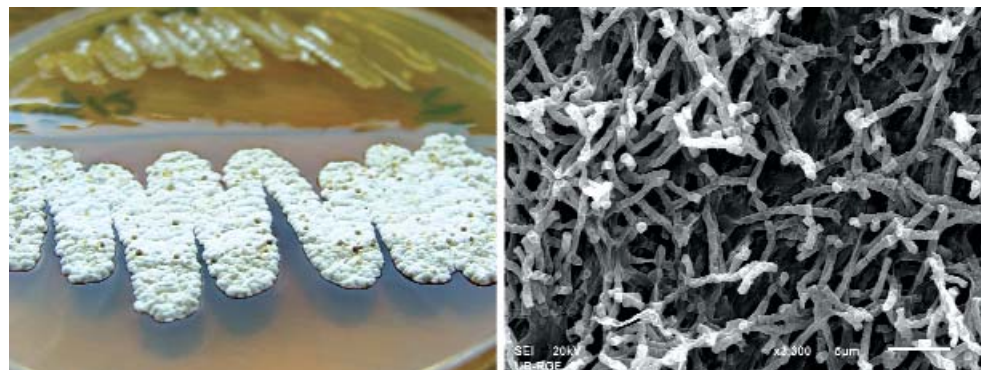
25
година • years

произвођача аминогликозида постојало је пре успостављања наше сарадње са лабораторијом др Грејема Кона са Универзитета у Манчестеру у Великој Британији (WellcomeTrust пројекат). Резултат ове сарадње било је одређивање тачног места деловања Sgm, KgmB и GrmA метилтрансфераза које метилују G1405 у оквиру A места на 16S рРНК молекулу. Такође смо утврдили дводоменску структурну организацију *sgm* метилтрансферазе (C- и N- терминални домени) и идентификовали аминокиселине које су одговорне за везивање кофактора, односно за каталитичку активност Sgm протеина. Аминокиселине на C-терминалном крају формирају Росманову структуру која је карактеристична за све 16S рРНК метилтрансферазе. Мутационом анализом утврђено је да су G135, D156 и D182 аминокиселине одговорне за везивање кофактора, док K199, E205, R236 и E267 аминокиселине имају улогу у трансферу метил групе на 30S субјединицу.

Упоредо са изучавањем молекуларних механизма резистенције на аминогликозидне антибиотике, у Лабораторији за молекуларну генетику и екологију микроорганизама почело је да се ради и на формирању колекције природних изоата актиномицета изолованих из различитих узорака. Бактерије су тестиране за производњу антибактеријских и фунгицидних секундарних метаболита, а развијен је и биолошки есеј за тестирање производње потенцијалних имуносупресора базиран на соју пекарског квасца. Инактивацијом гена VMA22 одговорног за морфологију и ацидификацију вакуола, добијен је сој *Saccharomyces cerevisiae* FAV20 који је сензитиван на FK506, познати макролидни имуносупресор. Поред тога, дизајнирани су и дегенерисани прајмери за PCR детекцију поликетид

синтаза типа I (PKS I) које су одговорне за синтезу макролидних антибиотика и имуносупресора. Користећи биолошки есеј и изрођене прајмере, из колекције актиномицета изолован је сој MS405. Корисћењем метода молекуларне таксономије утврђено је да се ради о новој врсти која је добила име *Streptomyces durmitorensis* sp. nov. Направљена је геномска козмидна библиотека овог соја и у току је секвенцирање PKS I генског кластера. У сарадњи са Институтом за микробиологију Академије наука Републике Чешке установљено је да сој *Streptomyces durmitorensis* sp. nov. производи нову фамилију полиенских макролида, а кључно једињење ове фамилије идентификовано је као 32,33-дидехидрофламиоин (DDHR).

Микробиолошки диверзитет је прво изучаван и у ризосферама две ендемореликтне биљке, *Ramonda serbica* и *Ramonda nathaliae*, за које је показано да излучују три пута више фенолних једињења него друге више биљке. Бактеријске заједнице пореклом из ризосфере ових биљака анализирани су метагеномским приступом. Флуоресцентна *in situ* хибридизација (FISH) и DAPI бојење показали су да у анализираним земљиштима има свега 5%

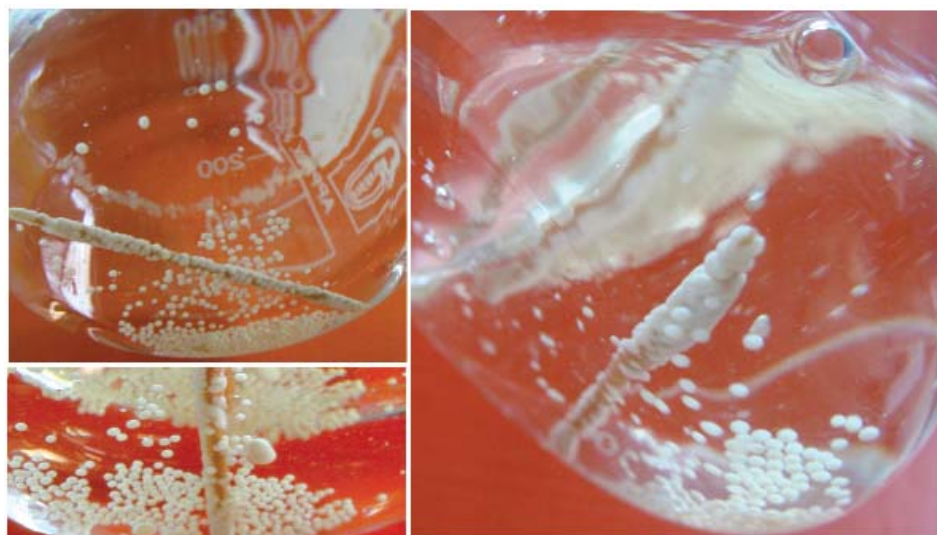




метаболички активних бактерија. Употребом прајмера специфичних за бактеријску ДНК умножени су гени за 16S рРНК и конструисане су две срединске библиотеке. Библиотеке су претраживане помоћу RFLP методе, а затим и секвенцирањем. Показано је да анализирани заједнице одликује веома мали диверзитет и већина добијених секвенци показала је малу сличност са ДНК секвенцама до сада култивисаних бактерија.

Класичним микробиолошким методама из ових узорака изоловане су бактерије које имају способност да разграђују високе концентрације фенола као и друга ароматична једињења (бензен, толуен, ксилен, стирен, нафтаген и сл.). Полифазним приступом одређена је таксономска припадност ових бактерија. Показано је да ове бактерије поседују веома ефикасне ензиме који учествују у путевима разградње фенола, а најзначајнији резултат добијен је у експериментима у којима је коришћена земља као модел-систем. Изоловане бактерије су врло ефикасно разграђивале фенол у овом модел-систему било да су биле инокулиране појединачне културе или да је коришћена смеша култура. Најбољи резултати су ипак постигнути са сојем *Bacillus* sp. PS11 који је показао да може да разгради 2 g фенола по килограму земље у року од само четири дана. За овај сој је показано да може да расте на 16 различитих ароматичних једињења и свакако је добар кандидат за употребу у биоремедијацији.

Изучавање микробиолошког диверзитета различитих станишта представља непресушну инспирацију за проналажењем нових гена, метаболита, микроорганизама. Стога су пројекти Лабораторије за молекуларну генетику и екологију микроорганизама осмишљени тако да се изучава микробиолошки диверзитет различитих станишта, при чему се увек примењују два комплементарна приступа – класични микробиолошки који подразумева култивацију бактерија и метагеномски приступ. На овај начин могуће је добити комплетнију слику бактеријског диверзитета, а истовремено и доћи до микроорганизама потенцијално корисних у различитим биотехнолошким процесима. Различита станишта која се изучавају у Лабораторији (од природних станишта која нису изложена антропогеном дејству, станишта која су потенцијално контаминирана, или са повећаним концентрацијама ароматичних угљоводоника, тешких метала, до станишта микроорганизама који насељавају угрожена културна добра) омогућавају нам да дођемо до



5% metabolically active microorganisms in the soil samples. We have isolated DNA from the soil samples and used bacterial 16S rDNA primers to amplify 16S genes and generate corresponding libraries. The libraries were screened by RLFP and by sequencing. Microbial communities associated with rhizosphere of these two plants were of limited diversity, as most of the sequenced samples had low similarity to known culturable bacteria.

Using standard microbiological approach, we have isolated bacteria capable of tolerating and degrading high amounts of phenol as a sole source of carbon and energy. We have shown that these bacteria could also degrade wide range of other aromatic compounds including toluene, benzene, xylene, styrene, naphthalene, etc. These isolates were identified using polyphasic approach and enzymes involved in catabolic pathway of phenol degradation were

characterized in crude cell extracts of the isolates. The most importantly, we have determined in soil model system that these bacteria successfully degraded 2 g of phenol per kg of soil either in mixed or as a single cultures. The best of all was *Bacillus* sp. PS11 that was able to degrade this amount of phenol within only four days. This isolate could also use 16 other aromatic compounds as a sole source of carbon and energy, thus making it excellent candidate for the bioremediation.

Studying microbial diversity of the various environmental samples is endless source of novel genes, metabolites and microorganisms. Thus, projects of the Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology are based around studying microbial diversity of various environmental samples using both metagenomic and traditional microbiological approach (isolating and cultivating the microorganisms). In this way, we are trying to obtain better and more complete information about microbial diversity on one side, and to be able to isolate potentially useful microorganisms for various applications in biotechnology on the other. We are covering samples from diverse environments including pristine and potentially contaminated sources (higher amounts of aromatic hydrocarbons, heavy metals) as well as samples from cultural heritage



sites. In this way, we are bioprospecting for interesting microorganisms, enzymes and metabolites with potential application in bioremediation and biotechnology.

Selected publications

1. Kojić M, Topisirović L, Vasiljević B. (1992) Cloning and characterization of an aminoglycoside - resistance determinant from *Micromonospora zionensis*. J. Bacteriol. 174, 7868-7872.
2. Kojić M, Topisirović L, Vasiljević B. (1996) Translational autoregulation of the *sgm* gene from *Micromonospora zionensis*. J. Bacteriol. 178, 5493-5498.
3. Vajić S, Anastasov N, Vasiljević B. (2004) The *kgmB* gene, encoding ribosomal RNA methylase from *Streptomyces tenebrarius*, is autogenously regulated. Arch. Microbiol. 182, 475-481.
4. Skoko N, Vujović J, Savić M, Papić N, Vasiljević B, Ljubijankić G. (2005) Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 useful in detection of immunosuppressants produced by soil actinomycetes. J. Microbiol. Methods. 61, 137-140.
5. Savić M, Vasiljević B. (2006) Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33, 423-430.
6. Savić M, Bratić I, Vasiljević B. (2007) *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 2119-2124.
7. Savić M, Ilić-Tomić T, Macmaster R, Vasiljević B, Conn GL. (2008) Critical residue for cofactor binding and catalytic activity in the aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. J. Bacteriol. 190, 5855-5861.
8. Savić M, Lovrić J, Ilić-Tomić T, Vasiljević B, Conn G.L. (2009) Determination of the target nucleotides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. NAR 37, 5420-5431.
9. Đokić L, Savić M, Narančić T, Vasiljević B. (2010) Metagenomic analysis of soil microbial communities. Arch. Biol. Sci. 62, 559-564.
10. Vojnović S, Ilić-Tomić T, Savić M, Bajkić S, Morić I, Vasiljević B. Comparative analysis of 16S rRNA methyltransferases conferring resistance to aminoglycoside antibiotics in producing strains. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (ed A. M. Vilas), v. 1 pp. 501-508 (2010). Formatex Research Center, Spain.

Projects

- Molecular genetics of micromonospora, within Structural and functional analysis of genes in industrial microorganisms (funded by Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1996–2000)

бактерија које производе различите метаболите, ензими, или су саме по себи интересанте због потенцијалне употребе у биремедијацији и биотехнологији.

Одабране публикације

1. Kojić M, Topisirović L, Vasiljević B. (1992) Cloning and characterization of an aminoglycoside - resistance determinant from *Micromonospora zionensis*. J. Bacteriol. 174, 7868-7872.
2. Kojić M, Topisirović L, Vasiljević B. (1996) Translational autoregulation of the *sgm* gene from *Micromonospora zionensis*. J. Bacteriol. 178, 5493-5498.
3. Vajić S, Anastasov N, Vasiljević B. (2004) The *kgmB* gene, encoding ribosomal RNA methylase from *Streptomyces tenebrarius*, is autogenously regulated. Arch. Microbiol. 182, 475-481.
4. Skoko N, Vujović J, Savić M, Papić N, Vasiljević B, Ljubijankić G. (2005) Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 useful in detection of immunosuppressants produced by soil actinomycetes. J. Microbiol. Methods. 61, 137-140.
5. Savić M, Vasiljević B. (2006) Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33, 423-430.
6. Savić M, Bratić I, Vasiljević B. (2007) *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 2119-2124.
7. Savić M, Ilić-Tomić T, Macmaster R, Vasiljević B, Conn GL. (2008) Critical residue for cofactor binding and catalytic activity in the aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. J. Bacteriol. 190, 5855-5861.
8. Savić M, Lovrić J, Ilić-Tomić T, Vasiljević B, Conn G.L. (2009) Determination of the target nucleotides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. NAR 37, 5420-5431.
9. Đokić L, Savić M, Narančić T, Vasiljević B. (2010) Metagenomic analysis of soil microbial communities. Arch. Biol. Sci. 62, 559-564.
10. Vojnović S, Ilić-Tomić T, Savić M, Bajkić S, Morić I, Vasiljević B. Comparative analysis of 16S rRNA methyltransferases conferring resistance to aminoglycoside antibiotics in producing strains. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (ed A. M. Vilas), v. 1 pp. 501-508 (2010). Formatex Research Center, Spain.

Пројекти

- Истраживање структуре и функције гена индустријских микроорганизама (пројекат основних истраживања), Потпројекат: Молекуларна генетика микромоноспора (Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 1996–2000)
- Молекуларна генетика микроорганизама и експресија гена од економског значаја (Основна истраживања, св. бр. 1512, Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2002–2005)



- Regulation of gene expression in antibiotic producer *Streptomyces tenebrarius* (пројекат финансирао ICGEБ, CRP/YUG00-05, 2001–2003)
- Експресија и регулација фармацеутски значајних гена у микроорганизмима (Основна истраживања, ев. бр. 143056, Министарство за науку и заштиту животне средине, 2006–2010).
- Structure-function studies of 16S rRNA methyltransferases: the basis of aminoglycoside antibiotic resistance and enzyme translational autoregulation (пројекат финансирао Wellcome Trust, 2006–2008)
- Search for new bioactive secondary metabolites (заједнички истраживачки пројекти Српске академије наука и уметности и Академије наука Чешке Републике, 2006–)
- Microbial diversity in the copper mine Bor (пројекат финансирао ICGEБ, CRP/YUG09-03, 2010–2012)
- Изучавање микробиолошког диверзитета и карактеризација корисних срединских микроорганизама (основна истраживања, ОН173048, Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2011–2014)

- Molecular genetics of microorganisms and expression of industrially important genes (funded by Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 2001–2005)
- Regulation of gene expression in antibiotic producer *Streptomyces tenebrarius* (funded by ICGEБ, CRP/YUG00-05, 2001–2003)
- Expression and regulation of pharmaceutically important genes in microorganisms (funded by Ministry of Science and Environmental Protection, Republic of Serbia, 2006–2010)
- Structure-function studies of 16S rRNA methyltransferases: the basis of aminoglycoside antibiotic resistance and enzyme translational autoregulation (funded by Wellcome Trust, 2006–2008)
- Search for new bioactive secondary metabolites (Cooperation Between the Academy of Sciences of the Czech Republic and the Serbian Academy of Sciences and Arts, 2006–)
- Microbial diversity in the copper mine Bor (funded by ICGEБ, CRP/YUG09-03, 2010–2012)
- Microbial diversity study and characterization of beneficial environmental microorganisms (funded by Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia, 2011–2014)



25
ГОДИНА - УСПЕХ

Лабораторија за молекуларну генетику индустријских микроорганизама
Laboratory for Molecular Genetics of Industrial Microorganisms



Laboratory for Molecular Genetics of Industrial Microorganisms

Head: Milan Kojić, PhD, Principal Research Fellow

Research team:

Ljubisa Topisirović, Professor
Milan Kojić, PhD
Đorđe Fira, Professor
Amarela Terzic Vidojević, PhD
Natasa Golić, PhD
Ivana Strahinić, PhD
Jelena Begović, PhD
Jelena Lozo, PhD
Branko Jovčić, PhD
Sanja Mihajlović, PhD
Katarina Veljović, MSc
Maja Tolinački, MSc
Milica Nikolić, MSc
Jovanka Lukić
Goran Vukotić

Лабораторија за молекуларну генетику индустријских микроорганизама

Руководилац: др Милан Којић, научни саветник

Списак истраживача:

проф. Др Љубиша Тописировић
др Милан Којић
проф. Др Ђорђе Фира
др Амареа Терзић Видојевић
др Наташа Голић
др Ивана Страхинић
др Јелена Беговић
др Јелена Лозо
др Бранко Јовчић
др Сања Михајловић
мр Катарина Вељовић
мр Маја Толиначки
мр Милица Николић
Јованка Лукић
Горан Вукотић

Abstract

The research interests of Laboratory for Molecular Genetics of Industrial Microorganisms (LMGIM) is focused on: a) collecting of natural isolates of lactic acid bacteria (LAB), as well as species of *Pseudomonas* and *Bacillus* genera isolated from different environments in order to find strains with relevant industry characteristics (potential probiotic strains, strains with biodegradation capability and biocontrol), b) studying the molecular mechanisms of bioactive compounds synthesis such as exopolysaccharides, proteinases, antimicrobial compounds, as well as testing the aggregation ability of strains c) construction of series of appropriate vectors for gene manipulation and cloning and studying the regulation and expression of genes of interest in selected industrial strains; d) study of the molecular basis of resistance to various antibiotics and their dissemination among pathogenic and nonpathogenic bacteria, e) study of bacterial interaction and microbe-host interaction f) construction of starter cultures with detailed characterization of LAB strains that can be used in further production of fermented products.

Research focus

Lactic acid bacteria (LAB) are of major industrial significance because of their use for humans' and animals' food fermentation, for centuries. Products based on the use of LAB were sour-milk drinks, cheese, wine, a variety of fermented meat products, pickled vegetables, and quality of silage for livestock feed. LAB have a great impact on the quality and nutritional value of these products, they contribute to the development of taste, smell and appearance of products, as well as the length of the product. Lately, the interest in the use of certain genera of LAB it has been significantly increased in order to improve health and prevent disease. Thus, lactobacilli and bifidobacteria are increasingly used in medicine, immunotherapy, stabilization and colonization of intestinal microflora in acute diarrhea, or in cases of damage to the intestinal mucosal tissue, and most recently as alternative to medical diets and after radiotherapy, as probiotics. LAB as probiotics are most often consumed as a fermented product or food supplement. So far studies of probiotics are mainly focused to LAB strains that are routinely used in industrial processes and very little is known about the genetic organization of LAB originating from natural habitats.

The main activity of LMGIM is focused on collecting and study of LAB from specific ecological localities where exist a centuries-old tradition of production and consumption of spontaneously fermented food within rural households ("natural starters"). Moreover, fermented products are a source of indigenous strains of lactobacilli with potential technological and probiotic properties, which can be used for the development of stable and high-functional starter.

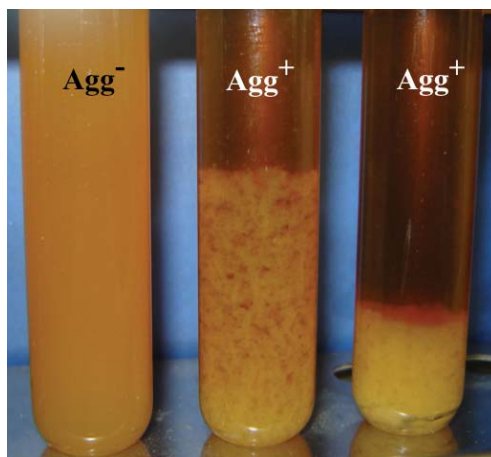
Апстракт

Истраживачко интересовање Лабораторије за молекуларну генетику индустријских микроорганизама (ЛМГИМ) усмерено је на: а) формирање колекција природних изолата бактерија млечне киселине (БМК), као и врста родова *Pseudomonas* и *Bacillus* пореклом из различитих средина с циљем проналажења сојева са релевантним индустријским карактеристикама (потенцијални пробиотички сојеви, сојеви који имају способност биодеградације и биолошке заштите); б) изучавање молекуларних механизма синтезе биоактивних једињења као што су ектополисахариди, биоактивни полипептиди, антимикробна једињења, као и тестирање агрегационих способности сојева; в) конструкцију серије одговарајућих вектора за манипулацију генима као и клонирање и проучавање регулације и експресије гена од интереса у одабраним индустријским сојевима; г) изучавање молекуларних основа резистенције на различите антибиотике као и њихове дисеминације између патогених и непатогених бактерија; д) изучавање међусобних бактеријских интеракција и интеракција микроорганизам-домаћин; ђ) конструисање стартер култура са детаљно окарактерисаним сојевима БМК који се могу користити у даљој производњи ферментисаних производа.

Фокус истраживања

Бактерије млечне киселине (БМК) имају велики индустријски значај јер се вековима користе за ферментацију хране за људе и животиње. Производи који се базирају на коришћењу БМК су кисело-млечни напци, сиреви, вина, различите ферментисане месне прерађевине, укисељено поврће, као и квалитетна силажа за исхрану стоке. БМК имају велики утицај на квалитет и нутритивну вредност наведених производа, јер доприносе развоју укуса, мириса и изгледа производа, као и дужини трајања производа. У последње време значајно се повећала заинтересованост за коришћење појединих родова БМК ради побољшања здравља и превенције болести код људи. Тако се лактобацили и бифидобактерије, као пробиотици, све више користе у медицини, имунотерапији, стабилизацији или колонизацији интестиналне микрофлоре код акутних дијареја или у случајевима оштећења мукозног ткива црева, а у последње време и као алтернатива у медицинским дијетама, као и после радиотерапија. БМК се као пробиотици најчешће конзумирају у облику ферментисаних производа или додатака у исхрани. До сада је у изучавању пробиотика главна пажња била посвећена сојевима БМК који се рутински користе у индустријским процесима, док је генетичка организација БМК пореклом из природних станишта недовољно изучавана.

Имајући у виду значај БМК, главна активност ЛМГИМ оријентисана је на колекционисање и изучавање БМК са специфичних еколошких локалитета где постоји вековна традиција производње и конзумирања спонтано ферментисаних производа у оквиру сеоских домаћинстава („природне стартер културе“). С обзиром на специфичности, ферментисани производи предст-





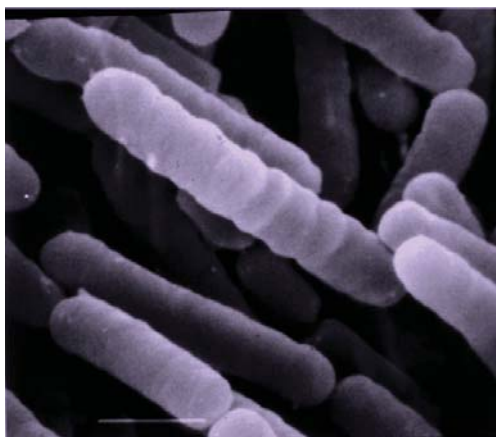
ављају извор аутохтоних сојева БМК са потенцијалним технолошким и пробиотичким својствима, који се могу употребити за развој стабилних и висококвалитетних функционалних стартера.

У току досадашњег рада ЛМГИМ формирана је јединствена колекција БМК (BG колекција), која садржи сојеве изоловане из традиционалних ферментисаних производа добијених са веома специфичних еколошких локалитета, као што су високе планине, планинске висоравни, долине река, острва, јадранска обала, као и БМК хуманог порекла укључујући оралне, интестиналне и вагиналне сојеве. Молекуларно-генетичка детерминација која је урађена методама гер-PCR-а, DGGE, RFLP и секвенцирања 16S рДНК показала је да постоји значајан диверзитет ових бактерија. С циљем изучавања микрофлоре у аутохтоним ферментисаним производима такође се користи и приступ изолације тоталне ДНК из узорка ферментисаних производа, праћен умножавањем гена за 16S рДНК и секвенцирањем.

Генетичке и биохемијске анализе показале су да, иако припадају истој врсти, изоловане БМК могу да синтетишу различите антимикробне супстанце укључујући и бактериоцине, као и да се разликују по врсти протеиназе коју синтетишу или способности да производе егзополисахариде (ЕПС) или врше агрегацију. Лабораторијска колекција БМК броји више од 1000 изолата, који су интересантни како с научног тако и са аспекта могућности примене ових бактерија у конструкцији стабилних стартер култура са јасно дефинисаним технолошким својствима. Такве стартер културе могле би се користити за производњу аутохтоних ферментисаних млечних производа са географским пореклом. С друге стране, коришћењем аутохтоних стартера спречио би се губитак микробиолошког диверзитета и сачувала аутентичност датог производа на одређеном подручју.

Детаљна молекуларна карактеризација технолошких и пробиотичких потенцијала природних изолата БМК се у ЛМГИМ реализује кроз конструкцију различитих вектора за клонирање и експресију релевантних гена у БМК, идентификацију и клонирање гена одговорних за производњу ЕПС-а и агрегацију, потенцијално нових гена за протеиназу и/или њихове домene, као и гена одговорних за синтезу и имуност на бактериоцине, изучавање регулације експресије клонираних гена, а одавно је секвенциран комплетни геном природног изолата *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 са потенцијалним пробиотичким својствима.

Изучавање експресије гена БМК изолованих из природних станишта веома је често ограничено проблемом немогућности њихове трансформације. Поред тога, неки од до сада конструисаних плаزمида не могу се пропагирати у многим природним изолатима чак и када су ти сојеви трансформабилни. Стога је један од главних циљева ЛМГИМ конструкција вектора који би могли да се користе за директну трансформацију БМК или који би били способни да омогуће конјугабилни трансфер плазмида из трансформабилних у нетрансформабилне сојеве. За ову сврху изоловани су и на молекуларном нивоу окарактерисани плазмиди из природних изолата различитих родова БМК и након тога ко-



During previous work of LMGIM a unique collection of LAB (BG collection) was formed. This collection includes strains isolated from traditional fermented products obtained from very specific ecological sites, such as high mountains, mountain plateaus, river valleys, islands, Adriatic Sea, and LAB of human origin, including oral, intestinal and vaginal strains. Strain determination based on molecular genetic techniques (rep-PCR, DGGE, RFLP and sequencing of 16S rDNA) showed that there is considerable diversity of these bacteria. In order to study the indigenous microflora in fermented products the isolation of total DNA from samples of fermented products, followed by amplification of 16S rDNA gene and sequencing has been also performed.

Genetic and biochemical analysis showed that, the natural isolates belonging to the same species can synthesize a variety of antimicrobial substances including bacteriocins, and differ by the type of proteinases, ability to produce exopolysaccharides (EPS), or aggregation ability. In LMGIM laboratory collection there are more than 1,000 isolates, which are of interest both scientifically and in terms of possible applications of these bacteria in the construction of stable starter cultures with well-defined technological properties. Such cultures could be used for the production of indigenous fermented milk products with geographical origin. On the other hand, by using indigenous starter the loss of microbial diversity could be prevented and the authenticity of the product in a particular area would be preserved.

Detailed molecular characterization of technological and probiotic potential of natural isolates of LAB in LMGIM is realized through: construction of different vectors for cloning and expression of relevant genes in LAB, identification and cloning of genes responsible for EPS production and aggregation, potentially novel genes for proteinase and / or their domain, as well as the genes responsible for synthesis and immunity to bacteriocins, study of regulation of expression of cloned genes and, more recently, sequencing the complete genome of natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 with potential probiotic properties.

Study of the gene expression in LAB isolated from natural habitats, is often limited due to the impossibility of their transformation. In addition, some of the plasmids cannot be propagated in natural isolates although the strains are transformable. Therefore, one of the main goals of LMGIM is construction of vectors that could be used for direct transformation of LAB or that would allow plasmid transfer from transformable into non-transformable strains by conjugation. For this purpose plasmids from natural isolates of different genera of LAB have been isolated and characterized at the molecular level, and used for the construction of new vectors. The structural and segregation stability of the resulting vector, and the ability to transfer large DNA fragments were analyzed. Special attention was paid to the construction of vectors with a wide host range. LMGIM has a significant collection of constructed vector, and attempts were made for their modification in order to improve some features such as the pres-

Analysis of antimicrobial activity of natural isolates from BG collection was performed and bacteriocins producing strains were detected. Bacteriocins efficient against pathogenic microorganisms such as: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. and others were particularly interesting. Bacteriocins strains of *L. lactis* BGS50 and BGMN1-5, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16, BGSJ2-8 and BGUB9, *L. salivarius* BGHO1 and *Enterococcus faecalis* BGPT1-10P were purified and fully biochemically characterized. Also, genes that provide a synthesis and immunity to these bacteriocins were

Анализом антимикробне активности откривени су сојеви који производе бактериоцине, а посебно се издвајају бактериоцидни који делују на патogene микроорганизме као што су *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. и други. Бактер-





иоцини сојева *Lactococcus lactis* BGS50 и BGMN1-5, *L. paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16, BGSJ2-8 и BGUB9, *L. salivarius* BGHO1, као и *Enterococcus faecalis* BGPT1-10P пречишћени су и комплетно биохемијски окарактерисани. Такође су клонирани и секвенцирани гени који обезбеђују синтезу и имуност на бактериоцине поменутих сојева, а изучавана је и њихова регулација. Показано је да су гени за синтезу бактериоцина у већини случајева лоцирани на плазмидима.

За поједине изолате из колекције потврђено је такође да показују и веома јаку способност агрегације ћелија, што је једна од значајних пробиотичких карактеристика. На основу анализе вањелијских протеина установљено је да је један од кључних протеина одговорних за агрегацију ћелија протеин молекулске масе веће од 200 kDa. Показано је да је агрегациони протеин укључен и у повећану отпорност ћелија на стресне услове и смањену доступност супстрата за протеиназу. Такође, анализом геномске секвенце утврђено је да се једна од компоненти укључених у способност агрегације налази на плазмиду.

Способност производње ЕПС-а до сада је најбоље окарактерисана код природног изолат *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. Показано је да производња ЕПС-CG11 зависи од састава медијума за раст и услова у којима се сој гаји. Окарактерисани полисахарид има оригиналну биохемијску структуру, а гени одговорни за његову биосинтезу лоцирани су на великом плазмиду. Тестирање утицаја ЕПС-CG11 и соја BGCG11 на епителијалне ћелије црева показало је да индукују производњу интерлеукина IL-17, IFN- γ , IL-10, TNF- α и IL-1 β .

Поред изолат *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11, у колекцији се налазе и изолати хуманог порекла. Тако су окарактерисани лактобацили припадници врста *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. celobiosus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* и *L. gasseri*. Показано је да је већина изолат *L. helveticus* BGRA43. Сој BGRA43 поред пробиотичких, поседује и бројне пожељне технолошке карактеристике које омогућавају да се употреби као монокултура за производњу ферментисаног млечног напитка типа јогурта или киселог млека и да се тако у организам унесе довољан број активних живих бактерија које ће испољити позитиван ефекат на организам човека („функционална” храна).

С обзиром на све већу присутност вишеструких резистенција бактерија на антибиотике, један од истраживачких задатака ЛМГИМ јесте и анализа резистенције на антибиотике, како потенцијалних пробиотика ради сигурности њиховог

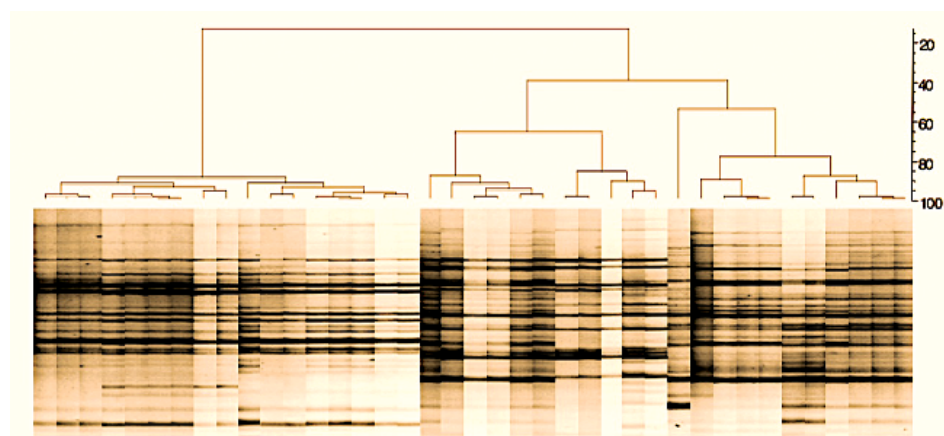
клонирани и секвенцирани, а њихове регулације су проучаване. Показано је да су гени за синтезу бактериоцина у већини случајева лоцирани на плазмидима.

За неке изолате је потврђено да показују веома јаку способност агрегације ћелија, што је једна од значајних пробиотичких карактеристика. На основу анализе екстрацелуларних протеина установљено је да је један од кључних протеина одговорних за агрегацију ћелија протеин молекулске масе веће од 200 kDa. Показано је да је агрегациони протеин укључен и у повећану отпорност ћелија на стресне услове и смањену доступност супстрата за протеиназу. Такође, анализом геномске секвенце утврђено је да се једна од компоненти укључених у способност агрегације налази на плазмиду.

Способност производње ЕПС-а до сада је најбоље окарактерисана код природног изолат *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. Показано је да производња ЕПС-CG11 зависи од састава медијума за раст и услова у којима се сој гаји. Окарактерисани полисахарид има оригиналну биохемијску структуру, а гени одговорни за његову биосинтезу лоцирани су на великом плазмиду. Тестирање утицаја ЕПС-CG11 и соја BGCG11 на епителијалне ћелије црева показало је да индукују производњу интерлеукина IL-17, IFN- γ , IL-10, TNF- α и IL-1 β .

Поред изолат *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11, у колекцији се налазе и изолати хуманог порекла. Тако су окарактерисани лактобацили припадници врста *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. celobiosus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* и *L. gasseri*. Показано је да је већина изолат *L. helveticus* BGRA43. Сој BGRA43 поред пробиотичких, поседује и бројне пожељне технолошке карактеристике које омогућавају да се употреби као монокултура за производњу ферментисаног млечног напитка типа јогурта или киселог млека и да се тако у организам унесе довољан број активних живих бактерија које ће испољити позитиван ефекат на организам човека („функционална” храна).

С обзиром на све већу присутност вишеструких резистенција бактерија на антибиотике, један од истраживачких задатака ЛМГИМ јесте и анализа резистенције на антибиотике, како потенцијалних пробиотика ради сигурности њиховог



С обзиром на све већу присутност вишеструких резистенција бактерија на антибиотике, један од истраживачких задатака ЛМГИМ јесте и анализа резистенције на антибиотике, како потенцијалних пробиотика ради сигурности њиховог

transfer of genetic material can be achieved between pathogenic and nonpathogenic bacteria, including lactobacilli). In contrast, during evolution bacteria have developed an efficient immune system (CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short palindromic Repeats), which provides resistance to foreign DNA, including plasmids. Understanding the role of CRISPR systems to prevent horizontal gene transfer, provides the basis for preventing the spread of antibiotic resistance. Therefore, LMGIM studies the new mechanisms for the dissemination and resistance to antibiotics, and the immune system in LAB.

Genus *Pseudomonas* and *Bacillus* are widespread bacteria adapted to life in soil, sewage, animal and plant tissues. The ability to grow and to colonize different habitats is a consequence of having a large number of regulatory genes whose expression is regulated by signals from the environment. Given the importance of these bacteria, especially in agriculture and medicine, part of experiments in LMGIM is dedicated to the study of regulation of gene expression in response to stress. Also, the research topics are molecular mechanisms of biodegradation and resistance of these bacteria to antibiotics. Additionally, the activity in this field consists of isolation and molecular characterization of bacterial strains from the soil, particularly natural isolates from the genus *Pseudomonas* and *Bacillus*, focusing on the strains with potential for use as biocontrol agents. The collections of natural isolates of *Pseudomonas* and *Bacillus* are subjected to the screening for antimicrobial activity against relevant plant pathogens, followed by the analysis of the structure of isolated antimicrobial compounds and identification of the genes responsible for their biosynthesis. The work in this field also includes the molecular characterization of the most virulent, newly isolated plant pathogens and the experiments *in planta*, in order to confirm the capacity of tested strains for use in biological control.

Selected publications

1. Topisirovic L, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J. (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 230-235.
2. Terzic-Vidojevic A, Vukasinovic M, Veljovic K, Ostojic M, Topisirovic L. (2007) Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlata cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 36-42.
3. Strahinic I, Busarcevic M, Pavlica D, Milasin J, Golic N, Topisirovic L. (2007) Molecular and biochemical characterization of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiol. Immunol.* 22, 111-117.
4. Nikolic M, Terzic-Vidojevic A, Jovcic B, Begovic J, Golic N, Topisirovic L. (2008) Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 162-170.

коришћења тако и у патогеним микроорганизмима који представљају извор гена за резистенцију, будући да хоризонтални трансфер генетичког материјала може да се остварује између патогених и непатогених бактерија укључујући и БМК. На супрот томе, бактерије су током еволуције развиле ефикасан имуни систем (CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) који обезбеђује резистенцију на страну ДНК укључујући и плазмиде. Разумевање улоге CRISPR система у спречавању хоризонталног трансфера гена даје основу за спречавање ширења резистенције на антибиотике. Стога се у ЛМГИМ ради на изучавању нових механизми дисеминације и резистенције на антибиотике, као и на изучавању деловања имуног система код БМК.

Род *Pseudomonas* и *Bacillus* чине широко распрострањене бактерије прилагођене животу у земљишту, отпадним водама, биљним и животињским ткивима. Способност да расту и насељавају различита станишта последица је поседовања великог броја регулаторних гена чија је експресија регулисана сигнаlima из спољне средине. Имајући у виду значај ових бактерија пре свега у пољопривреди и медицини, део експеримената у ЛМГИМ посвећен је изучавању регулације генске експресије при одговору на стрес. Такође, тема истраживања су и молекуларни механизми биодеградације и резистенције ових бактерија на антибиотике.

Додатно, активности ЛМГИМ у овој области обухватају и молекуларну карактеризацију природних изолата из родова *Pseudomonas* и *Bacillus* из биљног материјала, с циљем проналажења сојева са потенцијалом за коришћење у биолошкој контроли. У оквиру колекције природних изолата бактерија из родова *Pseudomonas* и *Bacillus*, одређује се спектар њиховог антагонистичког деловања на најзначајније биљне патогене, утврђује се структура антимикуробних супстанци које они синтетишу, уз идентификацију гена одговорних за њихову биосинтезу. Поред тога, врши се и молекуларна карактеризација највирулентнијих новоизолованих биљних патогена, као и експерименти *in planta*, с циљем потврђивања капацитета тестираних бактеријских сојева за примену у биолошкој контроли.

Одабране публикације

1. Topisirovic L, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J. (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 230-235.
2. Terzic-Vidojevic A, Vukasinovic M, Veljovic K, Ostojic M, Topisirovic L. (2007) Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlata cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 36-42.
3. Strahinic I, Busarcevic M, Pavlica D, Milasin J, Golic N, Topisirovic L. (2007) Molecular and biochemical characterization of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiol. Immunol.* 22, 111-117.
4. Nikolic M, Terzic-Vidojevic A, Jovcic B, Begovic J, Golic N, Topisirovic L. (2008) Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 162-170.
5. Strahinic I, Kojic M, Tolinacki M, Fira D, Topisirovic L. (2009) Molecular characterization of plasmids pS7a and pS7b from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis S50 as a base for the construction



of mobilizable cloning vectors. J. Appl. Microbiol. 106, 78-88.

6. Begovic J, Huys G, Mayo B, D'Haene K, Florez AB, Lozo J, Kojic M, Strahinic I, Topisirovic L. (2009) Human vaginal *Lactobacillus rhamnosus* harbor mutation in 23S rRNA associated with erythromycin resistance. Res. Microbiol. 160, 421-426
7. Veljovic K, Fira D, Terzic-Vidojevic A, Abriouel H, Galvez A, Topisirovic L. (2009) Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of enterococci isolated from fermented products. Eur. Food Res. Tech. 230, 63-70.
8. Jovcic B, Venturi V, Davison J, Topisirovic L, Kojic M. (2010) Regulation of the *sdsA* alkyl sulfatase of *Pseudomonas* sp. ATCC19151 and its involvement in degradation of anionic surfactants. J. Appl. Microbiol. 109, 1076-1083.
9. Kojic M, Lozo J, Jovcic B, Strahinic I, Fira D, Topisirovic L. (2010) Construction of a new shuttle vector and its use for cloning and expression of two plasmid-encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. Int. J. Food Microbiol. 140, 117-124.
10. Nikolic M, Jovcic B, Kojic M, Topisirovic L. (2010) Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. Europ. Food Res. Tech. 231, 925-931.

Пројекти

- Рекомбинатна ДНК у истраживању односа ген-протеин (пројекат основних истраживања). Потпројекат: Истраживање структуре и функције гена индустријских микроорганизама. Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1986–1990, 1991–1995
- Development of vectors for gene expression in lactobacilli. (страни пројекат). UNIDO, 1988–1990.
- Примена генетичког инжењерства у добијању starter култура бактерија млечне киселине (пројекат САНУ). Одбор за биомасу, САНУ, 1991–1995
- Развој технолошких поступака за добијање ферментисаних кисело млечних производа базираних на пробиотичким својствима бактерија млечне киселине (технолошки пројекат, бр.: КПП 183/2-93). Савезно министарство за науку и технологију, март-август 1993
- Развој технолошких поступака за производњу аутохтоних сирева (иновациони пројекат, бр.: ВХ 3.5.0533). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1994–1995 и 1995–1996.
- Истраживање структуре и функције гена индустријских микроорганизама (пројекат основних истраживања, бр.: 03Е10). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1996–2000
- Критеријуми валоризације апликативних потенцијала компоненти биодиверзитета Савезне Републике Југославије. Савезно министарство за науку, развој и животну средину СРЈ, 1997
- Изаолација и карактеризација бактерија млечне киселине за развој технолошког поступка за производњу специфичног копаоничког сира (иновациони пројекат, бр.: И.4.1826). Министарство за науку и технологију, Републике Србије, 1998–1999
- Characterisation of plasmids from natural isolates of lactobacilli useful for vector construction (страни пројекат). Савезно министарство за развој, науку и заштиту животне средине у ок-

5. Strahinic I, Kojic M, Tolinacki M, Fira D, Topisirovic L. (2009) Molecular characterization of plasmids pS7a and pS7b from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis S50 as a base for the construction of mobilizable cloning vectors. J. Appl. Microbiol. 106, 78-88.

6. Begovic J, Huys G, Mayo B, D'Haene K, Florez AB, Lozo J, Kojic M, Strahinic I, Topisirovic L. (2009) Human vaginal *Lactobacillus rhamnosus* harbor mutation in 23S rRNA associated with erythromycin resistance. Res. Microbiol. 160, 421-426
7. Veljovic K, Fira D, Terzic-Vidojevic A, Abriouel H, Galvez A, Topisirovic L. (2009) Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of enterococci isolated from fermented products. Eur. Food Res. Tech. 230, 63-70.
8. Jovcic B, Venturi V, Davison J, Topisirovic L, Kojic M. (2010) Regulation of the *sdsA* alkyl sulfatase of *Pseudomonas* sp. ATCC19151 and its involvement in degradation of anionic surfactants. J. Appl. Microbiol. 109, 1076-1083.
9. Kojic M, Lozo J, Jovcic B, Strahinic I, Fira D, Topisirovic L. (2010) Construction of a new shuttle vector and its use for cloning and expression of two plasmid-encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. Int. J. Food Microbiol. 140, 117-124.
10. Nikolic M, Jovcic B, Kojic M, Topisirovic L. (2010) Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. Europ. Food Res. Tech. 231, 925-931.

Projects:

- Investigation of recombinant DNA in relationship gene-protein. Investigation of gene structure and function of industrial microorganisms (funded by MSTRS, 1986–1990)
- Development of vectors for gene expression in lactobacilli (UNIDO 1988–1990)
- Application of genetic engineering to produce starter culture of lactic acid bacteria (funded by SASA, Board of biomass, 1991 – 1995)
- Development of technological procedures for sour fermented dairy products based on the probiotic properties of lactic acid bacteria (funded by FMST, KPR 183/2-93, March - August 1993)
- Development of technological procedures for the production of autochthonous cheeses (funded by MSTRS 1994–1995, 1995–1996, VH Z.5.0533)
- Investigation of gene structure and function of industrial microorganisms (funded by MSTRS, 1996–2000, Pr. No.: 03E10)
- Valorization criteria and application potential of components of biodiversity of the Federal Republic of Yugoslavia (funded by FMSDEFY, 1997)
- Isolation and characterization of lactic acid bacteria for the development of technological processes for production of specific Kopaonik cheese (funded by MSTRS, 1998–1999, Pr. No.: I.4.1826).
- Characterisation of plasmids from natural isolates of lactobacilli useful for vector con-



- struction (Federal Ministry for Development, Science and Environment - bilateral scientific collaboration between Yugoslavia and Bulgaria, 1998–1999)
- Molecular genetics of lactic acid bacteria (LAB) (funded by MSTRS, 2001–2005, Pr. No. 1442)
 - Regulation of gene expression in stationary phase in *Pseudomonas* sp. (ICGEB, Italy, 2003–2005, Pr. No. CRP/YUG03-01)
 - The development of technological processes for production of specific Zlatar cheese-based on molecular-genetically determined autochthonous lactic acid bacteria (funded by MSERS, 2005–2007, Pr. No.:BTN.351010.B)
 - Isolation of lactic acid bacteria to produce fermented milk drinks (funded by MSEPRS, 2006–2008, Pr. No.:BTN.5.1.4.7144.B)
 - The development of technological processes for production of fermented goat's milk products by using autochthonous lactic acid bacteria (funded by MSRS, 2007–2008, Pr. No.: 45-01-02960/2006-82)
 - Molecular characterisation of lactic acid bacteria isolated from autochthonous fermented white cheeses with geographical origin (CSK Food Enrichment BV, The Netherlands, 2006)
 - Study on the regulation of gene expression in relevant industrial microorganisms (funded by MSRS, 2006–2010, Pr. No.: 143036)
 - Lactobacilli - changes allergenic properties of fermented milk products and characterization of bacteriocins/Lactobacilles - changements des propriétés allergènes des produits laitiers fermentés et caractérisation des bactériocines (funded by Serbian-France Bilateral Scientific Collaboration "Pavle Savic", 2006–2007)
 - Proteolytic activity analysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains (страни пројект). CSK Food Enrichment BV, The Netherlands, 2007
 - Characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditionally produced cheeses in Serbia and Montenegro. CSK Food Enrichment BV, The Netherlands, 2007–2008
 - Use of lactic acid bacteria in production of hypoallergenic dairy products, and for the generation of mild antimicrobials (SEE-ERA.NET, 2007–2008, Pr. No.: 06-1000031-10522)
 - Molecular characterisation of bacteriocin producing strains (ICGEB, Italy, 2007–2009, CRP/YUG06-01)
 - Development of probiotic product for human usage by using lactic acid bacteria (funded by MSRS, 2008–2009, Pr. No.: 451-01-00065/2008-01/28)
 - Standardization of technological procedures for production of traditional Golija cheese using autochthonous lactic acid bacteria in order to protect geographical indications (funded by MSTRS, 2008–2011, Pr.No.: 20 111)
 - Isolation and characterisation of *Streptococcus thermophilus* from traditionally produced artisanal fermented milk products manufactured in the Southern-East Europe (CSK Food Enrichment BV, The Netherlands, 2009–2010)
 - Conservation and standardisation of traditional technologies of fermented milk products based on autochthonous lactic acid bacteria (SEE-ERA.NET, 2010–2012., Pr. No.: ERA 195)
 - виру Споразума Југославије и Бугарске о билатералној научној сарадњи, 1998–1999
 - Молекуларна генетика бактерија млечне киселине (БМК) (пројекат основних истраживања, бр.: 1442). Министарство за науку, технологије и развој Републике Србије, 2002–2005
 - Regulation of gene expression in stationary phase in *Pseudomonas* sp. (страни пројекат, бр.: CRP/YUG03-01). International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Italy, 2003–2005
 - Развој технолошког поступка за производњу специфичног златарског сира базираног на молекуларно-генетички детерминисаним аутохтоним бактеријама млечне киселине (технолошки пројекат, бр.: БТН.351010.Б). Министарство за науку и заштиту животне средине, Републике Србије, 2005–2007
 - Изолација бактерија млечне киселине у циљу производње ферментисаних млечних напитака (Национални програм - Биотехнологија и агроиндустрија, бр.: БТН.5.1.4.7144.Б). Министарство за науку и заштиту животне средине, Републике Србије, 2006–2008
 - Развој технолошког поступка за производњу ферментисаног киселомлечног производа од козијег млека применом аутохтоних бактерија млечне киселине (технолошки пројекат евиденциони број: 45-01-02960/2006-82). Министарство за науку и заштиту животне средине, Републике Србије, 2007–2008
 - Molecular characterisation of lactic acid bacteria isolated from autochthonous fermented white cheeses with geographical origin (страни пројекат). CSK Food Enrichment BV, The Netherlands, 2006
 - Изучавање регулације експресије гена одабраних индустријских микроорганизама (пројекат основних истраживања, бр.: 143036). Министарство за науку и заштиту животне средине, Републике Србије, 2006–2010
 - Лактобацили - промене алергених особина ферментисаних производа од млека и карактеризација бактериоцина / Lactobacilles - changements des propriétés allergènes des produits laitiers fermentés et caractérisation des bactériocines (страни пројекат) Међууладин програм научно-технолошке сарадње Србије и Француске „Павле Савић”, 2006–2007
 - Proteolytic activity analysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains (страни пројекат). CSK Food Enrichment BV, The Netherlands, 2007
 - Characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditionally produced cheeses in Serbia and Montenegro (страни пројекат). CSK Food Enrichment BV, The Netherlands, 2007–2008
 - Use of lactic acid bacteria in production of hypoallergenic dairy products, and for the generation of mild antimicrobials (страни пројекат, бр.: Нр 06-1000031-10522). SEE-ERA.NET, 2007–2008
 - Molecular characterisation of bacteriocin producing strains (страни пројекат, бр.: CRP/YUG06-01). International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Italy, 2007–2009
 - Развој пробиотичког препарата за хуману употребу на бази бактерија млечне киселине (иновациони пројекат, бр.: 451-01-00065/2008-01/28). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2008–2009
 - Стандардизација технолошког поступка традиционалне производње голијског сира приме-



ном аутохтоних бактерија млечне киселине у циљу заштите географских ознака порекла (технолошки пројекат, бр.: 20111). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2008–2011

- Isolation and characterisation of *Streptococcus thermophilus* from traditionally produced artisanal fermented milk products manufactured in the Southern-East Europe region (страни пројекат). CSK Food Enrichment BV, Leeuwarden, The Netherlands, 2009–2010
- Conservation and standardisation of traditional technologies of fermented milk products based on autochthonous lactic acid bacteria (страни пројекат, бр.: ERA 195). SEE-ERA.NET, 2010–2012
- Изучавање протеолитичке активности бактерија млечне киселине (страни пројекат). Међувладин програм Научно-технолошке сарадње између Србије и Француске „Павле Савић”, 2010–2011
- Characterisation of spectinomycin induced chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50 (страни пројекат, бр.: CRP/YUG10-01). International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Italy, 2011–2013
- Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности. (у оквиру програма ИИИ, бр.: 46010). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2011–2014
- *In vitro* и *ex vivo* интеракција пробиотичких сојева, произвођача егзополисахарида, са интестиналним епителним ћелијама (GUT-EPS) (страни пројекат). Међувладин програм Научно-технолошке сарадње између Србије и Краљевине Шпаније, 2011–2012
- Молекуларна карактеризација бактерија из родова *Bacillus* и *Pseudomonas* као потенцијалних агенаса за биолошку контролу. (основна истраживања, бр.: 173026). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2011–2014
- Изучавање гена и молекуларних механизма у основи пробиотичке активности бактерија млечне киселине изолованих са подручја западног Балкана (основна истраживања, бр.: 173019). Министарство за науку и технолошки развој, Републике Србије, 2011–2014

Награде

- Награда за најбољи магистарски рад из области молекуларне биологије (Фондација „Горан Љубијанкић”): Бранко Јовчић (2006) и Маја Толиначки (2007)
- Награда за најбољи магистарски рад коју додељује Српско Биолошко Друштво: Милица Николић (2007)
- Награда за најбољу докторску дисертацију из области молекуларне биологије (Фондација „Горан Љубијанкић”): Јелена Лозо (2009) и Бранко Јовчић (2010)

- Study of proteolytic activity of lactic acid bacteria (funded by Serbian-France Bilateral Scientific Collaboration “Pavle Savic”, 2010–2011)
- Characterisation of spectinomycin induced chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50 (ICGEB, Italy, 2011–2013., CRP/YUG10-01)
- Development of new encapsulation and enzyme technology for the production of biocatalysts and bioactive food components to increase its competitiveness, quality and safety. (funded by MSTRS, 2011–2014, Pr. No.: 46 010)
- *In vitro* and *ex vivo* interaction of probiotic strains, producers of exopolysaccharides, with intestinal epithelial cells (GUT-EPS) (funded by Serbian-Spain Bilateral Scientific Collaboration, 2011–2012)
- Molecular characterization of bacteria from the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*, as potential agents for biological control (funded by MSTRS, 2011–2014, Pr. No.:173026).
- Investigation of genes and molecular mechanisms underlying probiotic activity of lactic acid bacteria isolated from Western Balkans area (funded by MSTRS, 2011–2014, Pr. No.:173019)

Awards

- Branko Jovčić, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best MSc thesis in the field of molecular biology defended in 2006
- Maja Tolinački Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best MSc thesis in the field of molecular biology defended in 2007
- Milica, Nikolić, 2007, Award for the best MSc thesis awarded by Serbian Society of Biology
- Jelena Lozo, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best PhD thesis in the field of molecular biology defended in 2009
- Branko Jovčić Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best PhD thesis in the field of molecular biology defended in 2010



25
години - years

Лабораторија за молекуларну биологију биљака
Laboratory for Plant Molecular Biology



Laboratory for Plant Molecular Biology

Head: Dr Vesna Maksimović, principal research fellow

Svetlana Radović, PhD
Miroslav Konstantinović, PhD
Jovanka Miljuš Đukić, PhD
Mira Milisavljević, PhD
Gordana Timotijević, PhD
Jelena Samardžić, PhD
Dragana Nikolić, PhD
Jelena Aleksić, PhD
Bojana Banović, BSc
Živko Jovanović, BSc
Nemanja Stanisavljević, BSc

Лабораторија за молекуларну биологију биљака

Руководилац: др Весна Максимовић, научни саветник

др Светлана Радовић
др Мирослав Константиновић
др Јованка Миљуш Ђукић
др Мира Милисављевић
др Гордана Тимотијевић
др Јелена Самарџић
др Драгана Николић
др Јелена Алексић
Бојана Бановић
Живко Јовановић
Немања Станисављевић



Abstract

Group research focus is a study of the structure and expression profile of selected buckwheat genes coding for proteins of known functions (seed storage proteins) or proteins of undefined functions that are possibly involved in protein degradation and processing and/or are part of the stress response (aspartic proteinases and metallothionein). These genes, their promoters and translational products are important not only from the aspect of fundamental research but also regarding their potential agricultural/biotechnological application. In addition, we focus on molecular analysis of self-incompatibility (SI), which includes analysis of genetic diversity of wild populations of *Prunus* species (gametophyte SI), as well as dimorphic SI in buckwheat. We apply diverse genetic engineering methods such as: cloning, DNA sequencing, PCR, Real-time PCR, RNA-RNA *in situ* hybridization, gel electrophoresis, isoelectric focusing, EMSA, Western, Northern, Southern blots, gene transformation, recombinant protein production in heterologous systems and BY-2 cell culture.

Research focus

The model-plant of the projects in the period 2002-2010 was **buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)**. Genes/proteins of specific interest were seed storage proteins, aspartic proteinases, metallothioneins as well as those involved in self-incompatibility phenomena. Analysis of the regulation of gene expression of specific buckwheat genes has been an element in the process of understanding common mechanisms of regulation in plant cells as well as a basis for elucidating possible functions of these proteins in different physiological processes and stress conditions in buckwheat.

Our first model-gene/protein(s) from buckwheat were **seed storage proteins (SSPs)**, for a several reasons. SSPs are characterized by tissue specific (exclusively synthesized in seeds) and temporary (specific phases of seed development) gene expression and therefore are a good model for studying mechanisms of gene switching during late embryogenesis in specific tissues. They are also promising for molecular evolutionary research and could also be very useful for biotechnological application considering the attempts to improve seed quality artificially, especially concerning the proportions of essential amino acids.

Our work was firstly concentrated on analysis of the composition and structure of SSPs at the protein level. It was found that the main SSP of buckwheat was a 13S globulin (a legumin-like hexamer of non-identical subunits), but a new minor class 8S (vicilin type, trimer) and a 2S albumin fraction represented with single-chain polypeptides were also noticed. The high content of methionine and lysine in 2S albumin offers the possibility of gene transfer to cereals limited in these essential amino acids in order to improve their nutritional quality.

Апстракт

Основни научни циљ јесте проучавање структуре и регулације експресије одабраних гена биљака који кодирају протеине чија је функција позната (резервни протеини – РП), или оне чија функција није јасно дефинисана, али који потенцијално учествују у физиолошким процесима као што су деградација протеина и/или одговор на стрес – аспартичне протеиназе (АП) и металотионеин (МТ), на хељди као модел-биљци. Клонирани гени и одговарајући промотори анализирају се не само са фундаменталног аспекта већ и у вези са потенцијалном могућношћу биотехнолошке примене у пољопривреди. Посебан интерес усмерен је и на молекуларну анализу самоинкомпатибилности (СИ) на два система: представницима дивљих популација рода *Prunus* (гаметофитна СИ), који укључује и анализу генетичког диверзитета, као и на хељди (диморфни систем СИ). У истраживањима су примењиване савремене методе генетичког инжењерства и молекуларне генетике: клонирање, секвенцирање, PCR, RealTime PCR, биформатичка анализа, РНК-*in situ* хибридизација, гел-електрофорезе, EMSA, Western-blot, генетичка трансформација, продукција рекомбинираних протеина у хетеролошким системима, есеји са репортерским генима, култура ћелија BY-2.

Фокус истраживања

Хељда (*Fagopyrum esculentum* Moench) коришћена је као модел-биљка у пројектима које је финансирало Министарства за науку у оба пројектна периода (2002–2010). Анализа структуре и регулације експресије одабраних гена хељде била је допринос у процесу разумевања општих механизма регулације у биљним ћелијама, али и основа у појашњавању могуће функције протеина кодираних овим генима у различитим физиолошким процесима и условима стреса. Гени/протеини од интереса су резервни протеини семена, аспартичне протеиназе и металотионеини, као и они који учествују у процесима само-инкомпатибилности.

Опредељење за хељду почетно је потекло од интересовања за **резервне протеине семена (РПС)** ове биљке из неколико разлога: то је изузетан систем за анализу орган-специфичне (семе) и у развићу детерминисане (касна фаза ембриогенезе) експресије гена, као и посебног механизма транспорта протеина од места синтезе до места складиштења у протеинским телима, што је карактеристика свих РПС. Поред поређења података са РПС других биљака и употребе ових гена као молекулских маркера при молекуларно-евоуционим анализама, оно што издваја РПС хељде и што отвара могућност каналасања истраживања са фундаменталних на примењена, јесте изузетна нутритивна вредност протеина, што отвара могућност биотехнолошке примене у пољопривреди, преносом гена који кодирају ове протеине у друге биљке методама генетичке трансформације. Истраживања су у првој фази обухватала анализу композиције и структуре РПС на протеинском нивоу. Тако је констатовано да је главни РП хељде 13S глобулин (тип легумина, хексамер), а да су нешто мање заступљени 8S глобулин (тип вицилина, тример), као и 2S албумини (једноланчани полипептиди), фракција која се издваја по високом садржају метионина и лизина, па може бити веома добар кандидат за биотехнолошку примену везано за побољшање хранљиве вредности житарица.



У следећој фази конструисана је библиотека cDNA на матрици РНК средње фазе сазревања семена хељде, а затим су изоловани клонови cDNA- *FeLEG1* који кодира један од полипептида 13S легумина (AY256960) и 8S вицилина *FeVIC1* (AY536051) и уочен је специфичан профил њихове експресије. Методом PCR умножен је геномски клон *gFeLEG51* (AY359286), као први геномски клон за РПС хељде, а применом методе 5'-RACE и одговарајући 5'-регулаторни регион у којем је биоинформатичком анализом секвенце претпостављено постојање карактеристичних *cis*-регулаторних елемената.

При анализи протеинског профила семена, везано за РП, уочена је протеиназна активност која је по основним особинама (инхибиција пепстатином А и активност на киселом рН) указивала на својства карактеристична за **аспартичне протеиназе (АП)**. Ова класа ензима присутна је у читавом живом свету, па и код многих биљних врста, али иако се зна да ови ензими имају способност процесирања и деградације протеина, о егзактним функцијама закључује се само посредно, углавном на основу локализације, супстратне специфичности и на основу утицаја различитих физиолошких и фактора стреса на генску експресију.

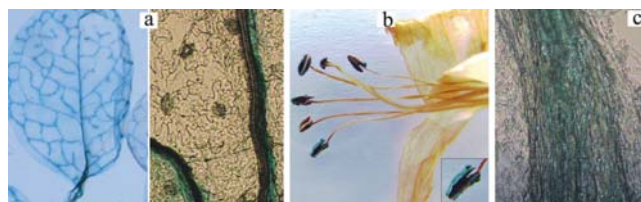
Из библиотеке cDNA семена хељде у средњој фази развића изолована је cDNA *FeAP9* (AY826351) и умножен одговарајући геномски фрагмент. Анализа изведене аминокиселинске секвенце показала је да *FeAP9* има структуру карактеристичну за типичне АП биљака. Показано је да се *FeAP9* експримира у семену, листу, корену, стаблу и цвету. Специфичан профил експресије уочен је током сазревања семена, синхронизовано са експресијом резервних протеина. Запажено је повећање експресије *FeAP9* при излагању листа хељде факторима абнотичког стреса (суша, мраком изазвана сенесценција и повећана концентрација кадмијума), као и у условима симулације напада патогена. Имунодетекцијом је показано да се протеин *FeAP9* акумулира током сазревања семена и да је присутан у почетним фазама герминације, након чега постепено ниво овог протеина опада. *FeAP9* је присутан у свим фазама развића листа, док је у природно сенесцентном листу интезитет сигнала најјачи. Из исте библиотеке cDNA изолована је и cDNA која кодира атипичну АП *FeAPL1* (AY536047) која не саржи домен PSI (карактеристика типичних АП биљака), а затим и одговарајући геномски клон чијом је анализом показано да не садржи интроне, а у 5'-регулаторном региону уочени су потенцијални *cis*-елементи који могу утицати на експресију овог гена под утицајем фактора спољашње средине и одредити експресију специфичну само за семе која је потврђена и методама RT-PCR и Real Time RT-PCR, као и методом Western blot на нивоу протеина. С циљем добијања протеина у количини потребној за биохемијску анализу и производњу антитела коришћено је неколико експресионих система за производњу рекомбинованог протеина: *E. coli*, *P. pastoris* и

In the next step, we started a search for corresponding SSP genes. From experiments analysing mRNAs throughout buckwheat seed development *in vitro*, we realized that mid-maturation was the stage with a high proportion of SSP mRNAs and a cDNA library was made. We have isolated and characterized a full-length cDNA coding for the 13S legumin-like storage polypeptide (AY256960) and 8S vicilin *FeVIC1* (AY536051). A specific expression profile was noticed. The genomic clone *gFeLEG51* (AY359286), was amplified as a first one published for a storage protein from buckwheat (belonging to 13S legumin-like) and analysis of its 5'-regulatory region showed the existence of several characteristic seed-specific *cis*-elements.

Analysis of seed protein processing led to the identification of proteolytic activity characteristic for **aspartic proteinases (AP)**. Although this class of enzymes is widespread in all living organisms, including plants, data on the exact biological functions are still hypothetical and are derived from analysis of expression in certain tissues or under specific conditions, and from co-localization studies with putative protein substrates.

A cDNA coding for *FeAP9* (AY826351) was isolated from the cDNA library of mid maturation buckwheat seeds. The deduced amino acid analysis showed typical structure for plant APs. It was demonstrated that *FeAP9* is expressed in buckwheat seeds, leaves, flowers and roots with a specific expression profile in seeds synchronized with expression of SSPs. Also, it was observed that the level of *FeAP9* expression dramatically increases during leaf senescence. Importantly, expression is upregulated by exposure of plants to drought, darkness, wounding and pathogen attack, indicating a likely role for the gene in stress responses. Immunodetection showed that *FeAP9* accumulated during seed development and was present in the early stages of germination. Moreover, *FeAP9* was detected in all stages of leaf development, as well as in pistils of fully opened buckwheat flowers.

Another cDNA clone coding for an atypical plant AP without the plant specific insert, *FeAPL1* (AY536047), was also isolated from the same cDNA library. Analysis of the genomic clone showed that it was an intron-less gene with a 5'-regulatory region rich in potential *cis*-elements influencing expression under various stress factors as well as seed-specific expression, which was confirmed by RT-PCR, Real Time PCR and Western blot analyses. After several trials for production of a sufficient amount of recombinant *FeAPL1* for biochemical analysis and production of antibodies in various heterologous systems, such as *E. coli*, *P. pastoris* and insect cell culture, an active MBP tagged enzyme was obtained in *E. coli* Rosetta-gami strain. More importantly, the active protein was also produced by the tobacco BY-2 cell line. Im-



Квалитативни GUS ese - тестирање промотора FeMT3
Qualitative GUS assay - FeMT3 promoter test



FeMT3 - заштита од стреса тешким металима
FeMT3 - heavy metal stress protection

munocytochemical analysis of transformed BY-2 cells and protein analysis of pro-toplasts showed cell wall localization of FeAPL1.

Plant **metallothioneins** (MTs) have a great impact on maintenance of metal homeostasis as well as in balancing the redox status of plant cells. Research on plant MTs lags behind that in animals by almost 25 years, but the functions of MTs are still a subject of controversy. An MT cDNA clone (AF056203), belonging to type 3, was isolated from the cDNA library of developing buckwheat seed. Subsequently, the corresponding genomic clone, comprising the 5' regulatory region, was identified (AY361956). Structural and functional analysis revealed Dof, Athb transcription factor binding sites on the proximal promoter fragment and nuclear protein extract binding sites on both proximal and distal parts of the promoter. Functional promoter analysis was performed with a complete 5'-regulatory region and two deletion variants, employing stably transformed tobacco plants. Histochemical GUS assay of transgenic tobacco lines detected the strongest signals in vascular elements of leaves and in pollen grains, while somewhat weaker staining was observed in the roots. Quantitative GUS assay showed strong up-regulation of all three promoter constructs (proportional to the length of the regulatory region) in leaves treated with Cu^{2+} and Cd^{2+} and submerged in liquid MS medium containing sucrose, after a prolonged time period. This represented a complex stress situation composed of several synergistically related stress stimuli.

The effects of heavy metal treatment and different abiotic stresses were monitored in buckwheat leaves employing Real-time PCR technology. Buckwheat plants were exposed to various metals, drought, oxidative stress, darkness and mechanical injuries. ROS (reactive oxygen species) production is a common consequence of most abiotic stresses, and increased expression of *FeMT3* during the stress could be connected with an ROS protection function of that protein. ROS protection abilities of *FeMT3* were confirmed in three different systems subjected to heavy metals: *E. coli*, *S. cerevisiae* and transiently transformed leaves of *N. debneyii*. Toxic metal concentrations caused less damage in cells and tissues expressing *FeMT3* compared to that in untreated controls.

FeMT3 transcripts were found in the root vascular system, the vascular system, mesophyll and guard cells in leaf, stem, flower and embryo-tissues of developing seeds.

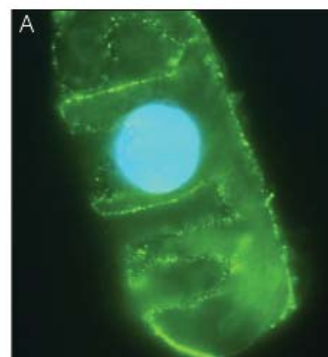
In contrast to phytochelators, the cytoplasmic localization of *FeMT3*-GFP fusion detected in transformed tobacco leaves was unchanged under heavy metal stress, suggesting a different defense mechanism against deleterious effects of heavy metals.

култура инсекатских ћелија. Задовољавајућа експресија добијена је само при употреби конструкта rMBP-FeAPL1 у соју Rosetta-gami *E. coli* када је добијен солубилан рекомбиновани фузиони протеин који поседује специфичну ензимску активност. Активан рекомбиновани протеин је експримиран и у ћелијској линији дувана BY-2. Имуноцитохемијском анализом и анализом протеина протопласта изведених из ових ћелија утврђено је да је FeAPL1 локализован у ћелијском зиду.

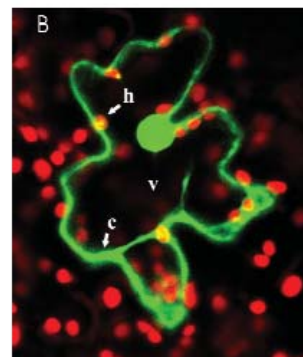
Металотионеини су, на основу специфичних својстава као што су висок капацитет за везивање јона метала и низак редокс потенцијал, такође били од посебног значаја с обзиром да је њихова функција генерално, а поготово на биљном систему, недовољно позната. Како је из библиотеке cDNA семена у средњој фази сазревања изолован и клон за металотионеин типа 3 (MT3) хељде (AF056203), отворена је могућност за анализу. Идентификован је и геномски клон, (AY361956), који је, поред кодирајуће секвенце, обухватао и део 5' регулаторног региона, па су конструисане одговарајуће делеционе варијанте на којима је извршена структурна и функционална анализа. Установљено је да проксимални фрагмент промотора *FeMT3* специфично везује пречишћене ДНК-везујуће домене транскрипционих фактора Dof1 и Athb, као и протеине нуклеарног екстракта семена хељде, а дистални фрагмент протеине нуклеарног екстракта листа хељде. Функционална анализа промотора рађена је у стабилно трансформисаном дувану. Хистохемијским есејом детектована је интензивна активност промоторских фрагмената у васкуларним елементима листа и у полену, а слабија у ткиву корена. У есеју са репортерским геном показано је значајно повећање активности промоторских фрагмената (пропорционално њиховим дужинама) у одговору на услове комплексног стреса. Јака индукција промоторске активности уочена је и под дејством јона Cu^{2+} и Cd^{2+} .

Ефекат различитих фактора стреса, а посебно тешких метала, анализиран је у листовима хељде методом Real-time RT-PCR код биљака излаганих јонима метала, суши, оксидативном стресу, мраку и механичким повредама. Производња реактивних кисеоничних врста пратилац је већине абиотичких стресова, па је повећана експресија *FeMT3* током њиховог деловања у вези са заштитном улогом од оксидативних оштећења. Протективне способности *FeMT3* потврђене су и у живим системима изложеним дејству тешких метала: *E. coli*, *cup1Δ* мутантима *Sacharomyces cerevisiae* и транзијентно трансформисаним листовима *Nicotiana debneyii*. Излагање високим концентрацијама метала изазивало је значајно спорији развој оштећења у ћелијама у којима је експримиран *FeMT3*, у поређењу са контролама.

Показано је да се *FeMT3* експримира током различитих фаза развића семена, као и у листу, цвету, стаблу и корену. Транскрипти гена за MT3 хељде локализовани су у спроводном систему корена; стоминим ћелијама, мезофилу и спроводним елементима листа; као и у ћелијама ембр-



BY2 - локализација FeAPL1
BY2 - FeAPL1 localization



Локализација FeMT3 - EYFP
FeMT3 - EYFP localization



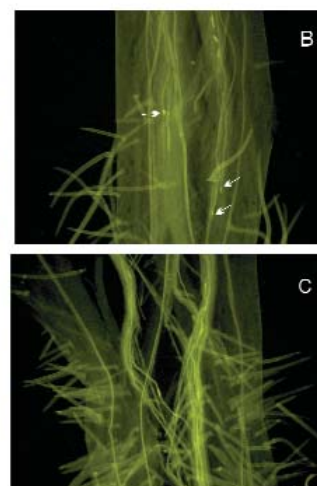
иона семена у развићу.

Цитосолна локализација фузионог протеина FeMT3-GFP детектована је у трансформисаним ћелијама листова дувана која остаје непромењена након третмана тешким металима, што упућује на другачији механизам одбрамбеног деловања металоиднеина према ефектима тешких метала у односу на фитохелатине.

Ови резултати указују да су функције MT3 везане како за одржавање хомеостазе метала тако и редокс хомеостазе. Показана својства протеина и промотора *FeMT3* указују на велики потенцијал овог гена за примену у биотехнологији, пре свега у фиторемедијацији земљишта загађених тешким металима.

Како је **стрес и одговор биљке на абиотички и биотички стрес** један од феномена који може повезивати све испитиване гене/протеине, у овом периоду урађени су експерименти везани за проучавање биохемијских и молекуларних основа одговора хељде на различите облике абиотичког стреса (UV-B зрачење, натријум-хлорид, алуминијум-хлорид, кадмијум, хипоксија и осмотски шок). Праћене су квалитативне и квантитативне промене у активности антиоксидативних ензима (супероксид дисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатион редуктаза), а уз употребу одговатајућих антитела промене у експресији протеина топлотног стреса и дехидрина. Ефекти стреса анализирани су на основу промена у интегритету мембрана и ДНК и праћењем дистрибуције и присуства водоник пероксида у ткивима.

Друга тематска област која је обухваћена наведеним пројектима односи се на проучавање **молекуларне основе феномена самоинкомпатибилности** на два система – дивљим популацијама рода *Prunus* и хељди. Испитиван је гаметофитни систем који спречава самооплођење код дивљих врста бадема. Узорци су узети из популација степског бадема – *Prunus tenella* и дивљег бадема – *Prunus webbii*. У испитиваним популацијама *Prunus tenella* идентификовано је више алелских варијанти гена за S-RNase (компонента тучка), а за одржане алеле и њихови „партнери” из полена – SFB алелске варијанте. Анализа генских секвенци је показала да је једна од S-RNase *Prunus tenella* идентична са једном S-RNase алелском варијантом *Prunus avium*, врстом која се не укршта са *Prunus tenella*, и да обе S-RNase имају 99% сличности са S-RNase *Prunus dulcis*. За разлику од S-RNase, полен-специфични SFB протеини у одговарајућим узорцима нису били идентични, а полинационни тестови потврдили су њихову очувану улогу у спречавању самооплођења. У испитиваној популацији *Prunus webbii* једна S-RNase показала је 99% сличности са једном S-RNase *Prunus dulcis*. Такође, идентификован је један неактиван алел, али разлог инактивације није пронађен на нивоу кодирајуће нуклеотидне секвенце. Поред тога, први пут у *Prunus webbii* уочене су тзв. „non- S-RNase”.



***Prunus tenella* - само-инкомпатибилност**
***Prunus tenella* - self-incompatibility**

Taken together with the high promoter inducibility and increased transcript level upon Cu^{2+} and Cd^{2+} exposure, these results strongly indicated that FeMT3 plays an important role in buckwheat heavy metal tolerance and hyperaccumulation. Moreover, the FeMT3 promoter and protein should be considered as new candidates for biotechnological applications, with great potential for use in biosensing and phytoremediation.

Since the **abiotic and biotic stress response** is one of the phenomena which could connect all investigated genes/proteins, we investigated the biochemical and molecular basis of the buckwheat response to abiotic stress (UV-B radiation, sodium chloride, aluminium chloride, cadmium, hypoxia and osmotic shock). Qualitative and quantitative alterations in antioxidative enzyme activity (superoxide dismutase, catalase, peroxidases and glutathione reductase) were investigated. The changes in expression of heat shock proteins and dehydrins were immunohistochemically analyzed. In addition, we examined the stress effect on DNA and membrane integrity, as well as on accumulation and distribution of hydrogen peroxide in different plant tissues.

Our other research interests include a study of the molecular mechanisms of **self-incompatibility (SI) systems** (that prevent self-fertilization) in wild *Prunus* species and buckwheat. We have studied gametophytic SI in *Prunus tenella* and *Prunus webbii*. In *Prunus tenella* several S-RNase alleles (female SI component) were identified and for some of them their SFBs, as their SI

male genes, were identified as well. Nucleotide sequence analysis revealed that one *P. tenella* S-RNase was identical to an S-RNase from *P. avium*, which is interesting because these two species do not intercross. Also, both these sequences showed high similarity (99%) to an S-RNase from *P. dulcis*. Intriguingly, although the S-RNases were identical, their SFB pairs were not identical and they were functional (confirmed by pollination test studies). In *P. webbii* one analyzed S-RNase showed high similarity (99%) with an S-RNase from *P. dulcis*. Furthermore, in *P. webbii* one inactive S-RNase was identified, but the reason for inactivation was not found at the coding sequence level. Also, in *P. webbii* a 'non-S RNase' was identified for the first time in this species, but is known to be present in other *Prunus* species. The 'non S-RNases' are interesting to investigate as the potential ancestral form of S-RNases. Recently, we started a study on heteromorphic sporophytic SI in buckwheat, a species which displays two flower morphs: pin and thrum with fertilization allowed only between different flower morphs. The proteins extracted from styles and pollen grains are planned for 2D-PAGE analyses in order to reveal differentially expressed proteins among different

morphs as well as among different pollinations (incompatible and compatible). The aim is to identify the proteins involved in the SI system in buckwheat.

Selected publications

- Samardžić J, Milisavljević M, Brkljačić J, Konstantinović M, Maksimović V. (2004) Characterization and evolutionary relationship of methionine-rich legumin-like protein from buckwheat. *Plant Phys. Biochem.* 42, 157-163.
- Brkljačić J, Majić D, Miljuš-Djukić J, Bratic A, Konstantinović M, Milisavljević M, Maksimović V. (2005) The metallothionein-like gene from buckwheat: Structural and functional analysis of the promoter region. *Int. J. Plant Sci.* 166, 889-900.
- Jovanović Z, Milošević J, Radović S. (2006) Antioxidative enzymes in the response of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) to ultraviolet-B-radiation. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9472-9478.
- Šurbanovski N, Tobutt K, Konstantinović M, Maksimović M, Sargent D, Stevanović V, Ortega E, Bošković R. (2007) Self-incompatibility of *Prunus tenella* and evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different SFB alleles coupled with an identical S-RNase allele. *Plant J.* 50, 723-734.
- Milisavljević M, Timotijević G, Radović S, Konstantinović M, Maksimović V. (2008) Two types of aspartic proteinases from buckwheat seed - Gene structure and expression analysis. *J. Plant Physiol.* 165, 983-990.
- Banović B, Šurbanovski N, Konstantinović M, Maksimović V. (2009) Basic RNases of wild almond (*Prunus webbii*): Cloning and characterization of six new S-RNase and one "non-S RNase" genes. *J. Plant Physiol.* 166, 395-402.
- Bratić A, Majić D, Samardžić J, Maksimović V. (2009) Functional analysis of the buckwheat metallothionein promoter: Tissue specificity pattern and up-regulation under complex stress stimuli. *J. Plant Physiol.* 166, 996-1000.
- Timotijević G, Milisavljević M, Radović S, Konstantinović M, Maksimović V. (2010) Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. *J. Plant Physiol.* 167, 61-68.
- Nikolić D, Samardžić J, Bratić A, Radin I, Gavrilović S, Rausch T, Maksimović V. (2010) Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) FeMT3 gene in heavy metal stress: protective role of the protein and inducibility of the promoter region under Cu2p and Cd2pTreatments. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3488-3494.
- Samardžić J, Nikolić D, Timotijević G, Jovanovic Z, Milisavljević M, Maksimović V. (2010) Tissue expression analysis of FeMT3, a drought and oxidative stress related metallothionein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *J. Plant Physiol.* 167, 1407-1411.

Projects

- The Role of Transcription Factors and small RNAs in Abiotic Stress Response in Plants and genetic Diversity of Plant Species Important for Agriculture and Biotechnology (funded by MNTRS, OI173005, 2011-2014)

Ове RNase су базни протеини и постоји актуелна хипотеза да би могле да представљају предачку форму S-RNase.

У овом периоду започет је и рад на анализи механизма хетероморфне самоинкомпатибилности код хељде. Изоловани су протеини из тучкова оба типа цвета, пин и трам. Циљ је идентификовање разлика у протеинском профилу ова два морфа, као и код инкомпатибилно и компатибилно опрашених, а које би се могле повезати са инкомпатибилном реакцијом. Користе се методе IEF, SDS и 2D електрофорезе.

Одабране публикације

1. Samardžić J, Milisavljević M, Brkljačić J, Konstantinović M, Maksimović V. (2004) Characterization and evolutionary relationship of methionine-rich legumin-like protein from buckwheat. *Plant Phys. Biochem.* 42, 157-163.
2. Brkljačić J, Majić D, Miljuš-Djukić J, Bratic A, Konstantinović M, Milisavljević M, Maksimović V. (2005) The metallothionein-like gene from buckwheat: Structural and functional analysis of the promoter region. *Int. J. Plant Sci.* 166, 889-900.
3. Jovanović Z, Milošević J, Radović S. (2006) Antioxidative enzymes in the response of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) to ultraviolet-B-radiation. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9472-9478.
4. Šurbanovski N, Tobutt K, Konstantinović M, Maksimović M, Sargent D, Stevanović V, Ortega E, Bošković R. (2007) Self-incompatibility of *Prunus tenella* and evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different SFB alleles coupled with an identical S-RNase allele. *Plant J.* 50, 723-734.
5. Milisavljević M, Timotijević G, Radović S, Konstantinović M, Maksimović V. (2008) Two types of aspartic proteinases from buckwheat seed - Gene structure and expression analysis. *J. Plant Physiol.* 165, 983-990.
6. Banović B, Šurbanovski N, Konstantinović M, Maksimović V. (2009) Basic RNases of wild almond (*Prunus webbii*): Cloning and characterization of six new S-RNase and one "non-S RNase" genes. *J. Plant Physiol.* 166, 395-402.
7. Bratić A, Majić D, Samardžić J, Maksimović V. (2009) Functional analysis of the buckwheat metallothionein promoter: Tissue specificity pattern and up-regulation under complex stress stimuli. *J. Plant Physiol.* 166, 996-1000.
8. Timotijević G, Milisavljević M, Radović S, Konstantinović M, Maksimović V. (2010) Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. *J. Plant Physiol.* 167, 61-68.
9. Nikolić D, Samardžić J, Bratić A, Radin I, Gavrilović S, Rausch T, Maksimović V. (2010) Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) FeMT3 gene in heavy metal stress: protective role of the protein and inducibility of the promoter region under Cu2p and Cd2pTreatments. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3488-3494.
10. Samardžić J, Nikolić D, Timotijević G, Jovanovic Z, Milisavljević M, Maksimović V. (2010) Tissue expression analysis of FeMT3, a drought and oxidative stress related metallothionein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *J. Plant Physiol.* 167, 1407-1411.



Пројекти

- Молекуларни механизми одговора биљака на абиотички стрес-улога транскрипционих фактора и малих РНК и анализа генетичког диверзитета биљних култура од интереса за пољопривреду и биотехнологију (173005). Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2011–2014
- Sustainable preservation of indigenous South East European legumes and their traditional food and feed products-SEE LEGUMES (SEE ERA NET Plus), 2011-2012
- Озиме махунарке за повећану одрживост различитих агроекосистема LEG-HIVER (пројекат билатералне сарадње са Француском - „Павле Савић“), 2010-2011
- Биоактивне супстанце ендемореликтних врста Балканског полуострва (пројекат билатералне сарадње са Словенијом), 2010-2011
- Структура, функција и регулација експресије одабраних биљних гена (143017). Министарство за науку и заштиту животне средине Републике Србије, 2006–2010
- Анализа експресије одабраних биљних гена– пут до функције и биотехнолошке примене (ЕВВ1451). Министарство за науку и технологију Републике Србије, 2002–2005
- Потпројекат: Анализа генетичког диверзитета дивљих врста рода *Prunus* у Србији и Црној Гори. Проучавање молекуларне основе само-инкомпатибилности код дивљих врста *Prunus tenella*, *Prunus webii*. Сарадњи са East Malling Research, East Malling, UK, 2005
- Унапређење технологије гајења воћа и винове лозе (БТР.5.04.0514.Б). Министарство за науку технологију и развој Републике Србије у сарадњи са East Malling Research, East Malling, UK, 2002
- Интродукција, стварање, проучавање и увођење у производњу нових сорти воћака и винове лозе побољшаних биолошких и привредних карактеристика (БТР.5.04.0525). Министарство за науку, технологију и развој Републике Србије у сарадњи са East Malling Research, East Malling, UK 2003
- Стандардизација теста за доказивање генетички модификоване соје методом PCR (И.4.1806). Министарство за науку, технологију и развој Републике Србије, 1998–1999

Награде

- Фондација „Горан Љубијанкић“ за докторске радове: Драгана Николић, 2010, Гордана Тимотијевић, 2009
- Фондација „Горан Љубијанкић“ за дипломске радове: Немања Станисављевић, 2010, Живко Јовановић, 2007, Бојана Бановић, 2005
- Награда ИМГТИ ауторима за објављени рад у часопису са највећим ИФ (6,751) 2007. Године: Šurbanovski N, Tobutt K, Konstantinović M, Maksimović M, Sargent D, Stevanović V, Ortega E, Bošković R. (2007) Self-incompatibility of *Prunus tenella* and evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different SFB alleles coupled with an identical S-RNase allele. Plant J. 50, 723-734

- Sustainable preservation of indigenous South East European legumes and their traditional food and feed products-SEE LEGUMES (SEE ERA NET Plus), 2011–2012
- Winter-sown legumes for enhanced sustainability of contrasting agroecosystems LEG-HIVER (Serbien-French Technology Co-Operation For Years 2010–2011, funded by MNTRS)
- Bioactive substances in endemo-relict plants of the Balkan Peninsula (Serbien-Slovenia Technology Co-Operation For Years 2010–2011, funded by MNTRS)
- Structure, Function and Regulation of Expression of Selected Plant Genes - basic research funded by Ministry of Science, Republic of Serbia (2006–2010)
- Expression analysis of specific plant genes - a way to the function and biotechnological application - basic research funded by Ministry of Science, Republic of Serbia (2002–2005)
- Screening of the genetic diversity of wild species of *Prunus* in Serbia and Montenegro, and studying the molecular basis of self-incompatibility in wild species of *Prunus* incorporated in the project of basic research. Part of the project is being done in collaboration with East Malling Research, East Malling, UK (2002–2005)
- The improvement of technology of fruit and grape growing (applied research funded by Ministry of Science, Republic of Serbia, in collaboration with the Agricultural Research Institute “Serbia “ and the Horticulture Research International, East Malling, UK (2002–2004)
- Introduction, production, research and implementation of new varieties of fruit trees and vines with improved biological and economic characteristics (BTR.5.04.0525). Ministry of Science, Technology and Development Republic of Serbia in cooperation with the East Malling Research, East Malling, UK 2003
- Standardization of PCR method for detection and identification of genetically modified soybean (Innovative project no. I4.1806), funded by MNTRS (1998-1999)

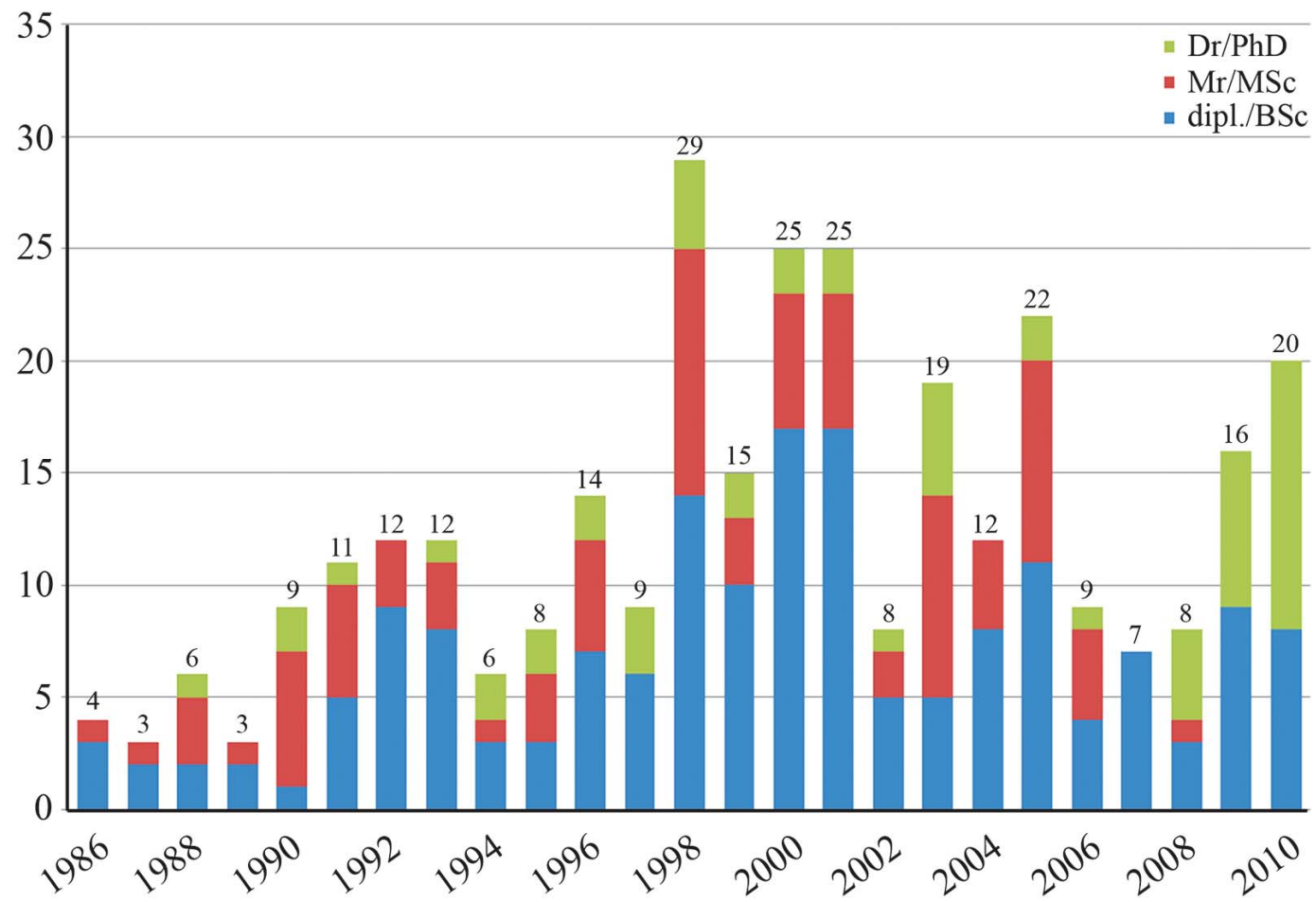
Awards

- Dragana Nikolić, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best PhD thesis in the field of molecular biology defended in 2010
- Gordana Timotijević, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best PhD thesis in the field of molecular biology defended in 2009
- Nemanja Stanisavljević, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best BSc thesis in the field of molecular biology defended in 2010
- Živko Jovanović, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best BSc thesis in the field of molecular biology defended in 2007
- Bojana Banović, Annual award of the “Goran Ljubijankić” Foundation for the best BSc thesis in the field of molecular biology defended in 2005
- Award for the publication with the highest impact factor (6,751) in IMGGE in 2007: Šurbanovski N, Tobutt K, Konstantinović M, Maksimović M, Sargent D, Stevanović V, Ortega E, Bošković R. (2007) Self-incompatibility of *Prunus tenella* and evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different SFB alleles coupled with an identical S-RNase allele. Plant J. 50, 723-734



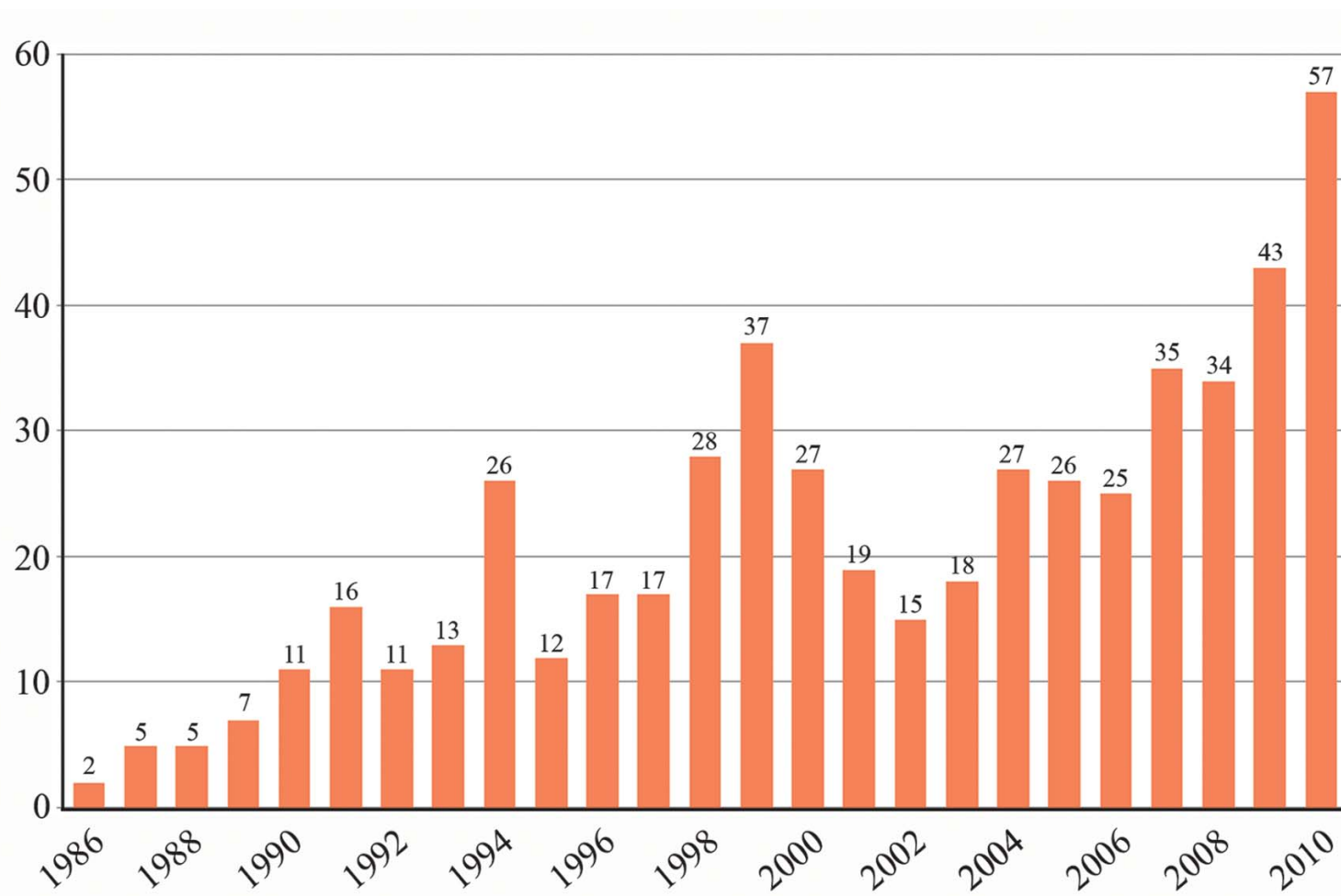
година • years

Одбрањени радови и дисертације
Completed theses and dissertations





Публикации
Publications



Perspectives

Research in the field of molecular biology and molecular genetics are still very diverse all over the world. Very often, it is believed scientific knowledge achieved in these areas will be the basis of 21st century technologies. The findings and the results obtained in molecular biology are the basis for the development of molecular biotechnology that is raised to a higher scientific and commercial level. In IMGGE, research is achieved in the field of molecular biology, including humans, microbial, plant and animal systems. The research is mainly focused on:

- (a) gene expression in microorganisms
- (b) gene expression in plants
- (c) molecular mechanisms of sex determination
- (d) molecular hematology
- (e) eukaryotic cells gene expression dependence on specific cell factors and local DNA organization
- (f) molecular diagnostics of hereditary disease

There is no doubt that in the future, research in molecular biology will be oriented towards the use of genetic engineering, considering the possibilities that such research approach offers. It should be noted that genetic engineering is actually derived from the results of independent fundamental research and discoveries in the field of molecular biology and molecular genetics. Its development over the past twenty years has significantly influenced scientific research, not only in biology, but also in other areas where this technology can be applied. Genetic engineering has allowed better understanding of the structure and function of genes in the genomes of various living systems. In addition to the fact that genetic engineering became an important tool in fundamental research in molecular biology, it has also found application in many other fields such as biotechnology, pharmaceuticals, agriculture, medicine, and thus enabled the introduction of molecular biology in these areas. This approach provides the basis for much practical and beneficial application of the results of basic research in molecular biology. Therefore, it is realistic to expect that the 21st century will be the century of molecular biology. This has a real foundation in the fact that the industrial production will be based largely on a new, molecular biotechnology (biotechnology based on the achievements of molecular biology and genetic engineering). These technologies will enable, among other things, obtaining active proteins for medical and veterinary use, biodegradable plastics, new generation of vaccines, transgenic plants and animals, genetically modified organisms (GMOs) with exactly desired properties. It is anticipated that a large number of technologies of the 21st century will be based on GM organisms and related processes of molecular biotechnology. In addition, it is expected that many problems related to the implementation of environmental

Перспективе развоја

Истраживања у молекуларној биологији и молекуларној генетици су, данас, веома разноврсна у свету. Често се говори да ће научна сазнања у овим областима бити основа технологије 21. века, јер се на основу ових сазнања развија молекуларна биотехнологија, односно биотехнологија се подиже на много виши научни, али и комерцијални ниво. У ИМГГИ истраживања се реализују у области молекуларне биологије микроорганизама, биљних и животињских система, укључујући и човека. Истраживања су везана за изучавања:

- (a) експресије гена микроорганизама;
- (b) експресије гена биљака;
- (v) молекуларних механизма детерминације пола;
- (r) молекуларне хематологије;
- (d) експресије еукариотских гена зависне од специфичних ћелијских фактора и локалне организације саме ДНК;
- (h) усмерена на молекуларну дијагностику наследних болести итд.

Свакако да ће се истраживања у молекуларној биологији, у будућности, све више оријентисати на коришћење генетичког инжењерства, имајући у виду могућности које овакав приступ истраживањима омогућава. Треба истаћи да је генетичко инжењерство заправо проистекло из резултата независних основних истраживања и открића баш у области молекуларне биологије и молекуларне генетике. Његов развој у последњих двадесетак година значајно је утицао на истраживања не само у биологији већ и у другим областима где се ова истраживачка технологија може применити. Генетичко инжењерство је омогућило да се боље разуме структура и функција гена у оквиру генома различитих живих система. Поред тога што је генетичко инжењерство постало незаменљиво у основним истраживањима у молекуларној биологији, оно је нашло примену и у многим другим делатностима, као што су биотехнологија, фармацеутска индустрија, пољопривреда, медицина, и на тај начин омогућило увођење знања из молекуларне биологије и у ове области. Овакав приступ даје основу и за велику практичну корист примене резултата основног истраживања у области молекуларне биологије. Стога, није нереално очекивати да ће 21. век бити век молекуларне биологије. То има реалну подлогу и у чињеници да ће се индустријска производња заснивати у великој мери на **новој, молекуларној биотехнологији** (биотехнологија заснована на достигнућима молекуларне биологије и генетичког инжењерства). Ова технологија омогући ће, поред осталог, добијање активних протеина за медицинску и ветеринарску употребу, добијање биоразградиве пластике, добијање нове генерације вакцина, добијање трансгених биљака и животиња, генетички модификованих организама (ГМО) са тачно жељеним својствима, итд. Стога није чудно што се предвиђа да ће велики број технологија 21. века бити базиран на ГМО, односно на процесима молекуларне биотехнологије засноване на



њима. Поред тога, очекује се да ће и многи проблеми у реализацији програма заштите животне средине бити успешно решени коришћењем знања из молекуларне биологије и генетичког инжењерства (на пример, конструкција специфичних микроорганизама који ће моћи да врше разградњу органских загађивача животне средине). Свакако да је и генска терапија (измена болесног гена на хромозому копијом „здравог” гена) једно од великих достигнућа које се заснива на разумевању молекуларне биологије ћелије и коришћењу генетичког инжењерства. Овакав приступ даје огромне потенцијале развоју хумане и ветеринарске медицине.

Имајући све наведено у виду, обезбеђење будућности земље и повезивања са светом се у великој мери заснива на сазнањима молекуларне биологије и примени резултата тих сазнања у пракси. С таквом идејом ИМГГИ је и основан и у свом досадашњем истраживачком раду постигао је запажен успех. Своју перспективу развоја ИМГГИ види у квалитативном и квантитативном расту (отварању нових лабораторија са светски компетентним руководиоцима и сарадницима са перспективним пројектима) као и у унапређењу постојећих. ИМГГИ ће, такође, своје активности усмерити и на проширење истраживачке сарадње како у земљи тако и у иностранству и стално ће покушавати да реализује међународне уговоре, који обезбеђују дугорочну сарадњу. Таква политика обезбедиће и трансфер знања између партнера учесника у пројектима, те на тај начин омогућити пласман нашег знања на међународном нивоу. Примена научних резултата ИМГГИ допринеће напретку медицине, ветерине, пољопривреде и фармацеутске индустрије. Све активности ИМГГИ усмерене су на подизање квалитета науке у Србији на виши ниво, што је у складу са стратегијом научног и технолошког развоја Србије.

Други приоритет ИМГГИ, али не и по важности, јесте повезивање и проширивање наставне базе Универзитета у овој области у којој је ИМГГИ изузетно компетентан. Овакав приступ обезбедио би сталан проток и рационализацију образовања кадрова и студената чланица Универзитета које су заинтересоване за рад у овој области. Стога је и мотив ИМГГИ био да се кандидује и постане чланица Универзитета у Београду. За примарни циљ ИМГГИ је поставио достизање статуса водеће научне институције у региону у области молекуларне биологије, молекуларне генетике и генетичког инжењерства као и статус потпуно равноправног партнера на светском научном нивоу.

programs will be successfully solved by applying knowledge of molecular biology and genetic engineering (for example, construction of specific microorganisms that are able to carry out the degradation of organic pollutants from the environment).

Moreover, gene therapy (replacement of sick genes in chromosome with a copy of “healthy” genes) represents one of the great achievements based on the understanding of molecular cell biology and the use of genetic engineering. This approach provides enormous potential for the development of human and veterinary medicine.

Considering all these, the future of the country and networking with the world is largely linked to the knowledge of molecular biology and application of the results of into practice. This was the idea when IMGGE was established and the institute has achieved a significant success in the research area. The future development of IMGGE is seen in qualitative and quantitative growth (opening of new laboratories with world-competent leaders and associates with attractive projects) as well as improvement of existing ones. In addition, IMGGE will focus its activities towards the expansion of research cooperation both at home and abroad, and will always try to implement international agreements, which provide long-term cooperation. Such a policy will ensure the transfer of knowledge among participants in the project and thus enable the placement of our knowledge at the international level. The application of scientific results IMGGE will contribute to the development and progress of medicine, veterinary medicine, agriculture and pharmaceutical industries. All activities of IMGGE are directed towards the raising of the quality of science in Serbia, and this tendency is in line with the of scientific and technological development strategies of Republic of Serbia.

Another priority of IMGGE is networking and expanding the teaching and educational base of the University in this area of expertise, where IMGGE is leading institute in the country. This approach will provide a continuous flow and rationalization of education, including staff and students that are members of the University who are interested to work in this area. Therefore, the motivation of IMGGE was to stand and become a member of the University of Belgrade. The ultimate goal of IMGGE is to achieve the status of a leading regional scientific institution in the field of molecular biology, molecular genetics and genetic engineering and to become a full partner in the global scientific network.

National Collaboration

- Center for Food Quality Research Ltd, Belgrade
- Central Institute for Conservation, Belgrade
- Clinical Center of Serbia, Belgrade
First Surgical Clinic
Institute of Cardiovascular Diseases
Institute for Gastroenterology
Institute for Hematology
Institute of Occupational Health and Radiological Protection "Dr Dragomir Karajović"
- Clinical Center of Vojvodina, Novi Sad
- Clinical Center "Zvezdara"
- Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Zemun
- Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade
Institute of Botany and Botanical Garden Jevremovac
- Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade
Chair of Organic Chemistry
- Faculty of Mining and Geology, University of Belgrade, Belgrade
Department of Petrology and Geochemistry
- Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade
Chair of Organic Chemistry
Institute of Medical Biochemistry
- Faculty of Philosophy, University of Belgrade, Belgrade
- Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade
- Fruit Research Institute, Čačak
- Galenika a.d., Belgrade
- Gynecology and Obstetrics Clinic "Narodni Front", School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade
- Gynecological Hospital Sretenović, Belgrade
- Institute for Applied Nuclear Energy INEP, University of Belgrade, Belgrade, Department for Biology of Reproduction
- Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Belgrade
- Institute for Forage Crops, Kruševac



Сарадња у земљи

- Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд
Институт за ботанику и Ботаничка башта „Јевремовац“
- Војномедицинска академија, Београд
- Галеника а.д., Београд
- Гинеколошка болница Сретеновић, Београд
- Гинеколошко акушерска клиника „Народни Фронт“, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Институт друштвених наука, Београд
- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, Београд
- Институт за здравствену заштиту мајке и детета „Др Вукан Чупић“, Београд
Лабораторија за медицинску генетику
Служба за хематологију и онкологију
Служба за испитивање и лечење метаболичких болести и клиничку генетику, одсек Генетско саветовалиште
- Институт за крмно биље, Крушевац
- Институт за ментално здравље, Центар за медицинску генетику, Београд
- Институт за мултидисциплинарна истраживања, Београд
- Институт за ортопедско-хируршке болести „Бањица“, Београд
- Институт за плућне болести и туберкулозу, Београд
- Институт за повртарство, Смедеревска Паланка
- Институт за примену нуклеарне енергије ИНЕП, Универзитет у Београду, Београд, Одељење за биологију репродукције
- Институт за ратарство и виноградарство, Чачак
- Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад
- Институт за трансфузију крви Србије, Београд
- Институт за филозофију и друштвену теорију, Универзитет у Београду, Београд
- Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду, Београд, Центар за хемију
- Институт за хигијену и технологију меса, Београд
- КБЦ Звездара, Београд



- Клинички центар Војводине, Нови Сад
- Клинички центар Србије, Београд
- Институт за гастроентерологију
- Институт за кардиоваскуларне болести
- Институт за медицину рада и радиолошку заштиту „Др Драгомир Карајовић“
- Институт за хематологију
- Прва хируршка клиника
- Клиничко-болнички центар „Др Драгиша Мишовић“, Београд
- Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Институт за биологију и хуману генетику
- Клиника за дечију неурологију и психијатрију
- ПИК Бечеј Пољопривреда, Бечеј
- ПКБ ИНИ Агроекономик, Падинска Скела, Београд
- Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, Земун
- Рударско-геолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Катедра за петрологију и геохемију
- Сојапротеин а.д., Бечеј
- Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Универзитетска дечија клиника, Београд:
- Лабораторија за клиничку микробиологију
- Служба за пулмологију и алергологију
- Служба за хематоонкологију
- Универзитетски клинички центар Звездара, Одељење за пулмологију, Београд
- Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Институт за медицинску биохемију
- Катедра за органску хемију
- Филозофски факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Хемијски факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Катедра за органску хемију
- Центар за испитивање намирница, Београд
- Центар за медицинску генетику, Институт за здравствену заштиту деце и омладине Војводине, Нови Сад
- Централни институт за конзервацију – ЦИК, Београд

- Institute for Multidisciplinary Research, Belgrade
- Institute for Philosophy and Social Theory, University of Belgrade, Belgrade
- Institute for Tuberculosis and Lung Disease, University Clinical Center of Serbia
- Institute for Vegetable Crops, Smederevska Palanka
- Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Department of Chemistry
- Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad
- Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade
- Institute of Mental Health, Belgrade
- Institute of orthopaedic-surgery “Banjica”, Belgrade
- Institute of Social Sciences, Belgrade
- Medical Center “Dr Dragiša Mišović”, Belgrade
- Medical Genetic Center, Institute for child and youth health care of Vojvodina, Novi Sad
- Military Medical Academy, Belgrade
- Mother and Child Health Institute of Serbia “Dr. Vukan Čupić”, Belgrade
- Department of hematology and oncology,
- Department of metabolic diseases and clinical genetics
- Laboratory of Medical Genetics
- National Blood Transfusion Institute, Belgrade
- PIK Bečej Poljoprivreda, Bečej
- PKB INI Agroeconomik, Padinska Skela, Belgrade
- School of Medicine, University of Belgrade
- Clinic for Child Neurology and Psychiatry
- Institute of Biology and Human Genetics
- Sojaprotein, Bečej
- University Children’s Hospital, Belgrade:
- Department of Allergology and Pulmonology
- Department of Hematology/Oncology
- Department of Clinical Microbiology
- University Clinical Center Zvezdara, Department of Pulmology, Belgrade



Међународна сарадња / International Collaborations

Белгија / Belgium

Center for Human Genetics, K.U.Leuven, Gasthuisberg O&N, Leuven

Грчка / Greece

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens, Athens
Hematology Department and HCT Unit, G. Papanicolaou Hospital, Thessaloniki
University of Patras, School of Health Sciences, Department of Pharmacy, Patras

Италија / Italy

Centro Ricerca M. Tettamanti, Università di Milano-Bicocca, Monza
International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), AREA Science Park, Trieste
Unit of Molecular and Cellular Neuroscience, Division of Neuroscience, Vita-Salute San Raffaele University and San Raffaele Institute, Milan
University of Verona, Department of Mother and Child, Biology and Genetics, Verona

Немачка / Germany

Laboratory for Plant Molecular Physiology, Heidelberg Institute for Plant Sciences, Heidelberg
Friedrich-Baur-Institut, Neurologische Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich

Сједињене Америчке Државе / USA

Department of Biochemistry, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia
University of Illinois at Chicago, Chicago

Словенија / Slovenia

Jožef Štefan Institute, Ljubljana

Уједињено Краљевство / United Kingdom

Children's Brain Tumour Research Centre, Institute of Genetics, School of Biology, Queen's Medical Centre, University of Nottingham, Nottingham
Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge
Manchester Interdisciplinary Biocentre, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester

Француска / France

National Institute for Agricultural Research (INRA), Dijon
National Institute for Agricultural Research (INRA), Nantes

Холандија / The Netherlands

CSK Food Enrichment, Leeuwarden
Erasmus University Medical Center, Faculty of Medicine and Health Sciences, MGC-Department of Cell Biology and Genetics, Rotterdam
NIZO food research BV, Ede
The Dutch Steering Committee on Orphan Drugs, The Hague

Чешка Република / Czech Republic

Institute of Biology & Medical Genetics of 2nd Medical School and of University Hospital Motol, Charles University Prague, Prague
Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague

Швајцарска / Switzerland

Multidisciplinary Oncology Center (CePO), Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC), Epalinges

Шпанија / Spain

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, Madrid
Inter-University Chair in Law and Human Genome, University of Deusto and University of Basque Country, Bilbao
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Villaviciosa, Principado de Asturias

Спонзори / Sponsors



Excellence in Routine and Science



ALFATRADE ENTERPRISE D.O.O.



ProMed
Specialists In Laboratory Supp



Уреднице / Editors
Јелена Беговић и Ивана Морић

Београд / Belgrade
2011