

ИНСПИРИСАНИ НАУКОМ ТРИДЕСЕТ ГОДИНА



THIRTY YEARS INSPIRED BY SCIENCE



## Садржај Content

Foreword	3	Уводна реч
History	4	Историјат
Organization	9	Организација
Laboratories	12	Лабораторије
Education	70	Образовање
Popularization of science	70	Популаризација науке
Innovations and technology development	72	Иновације и технолошки развој
Services	74	Услуге
Collaborations	76	Сарадња
Publications and Theses	79	Публикације и развој научног кадра
Friends of IMGGE	80	Пријатељи ИМГГИ

## Уводна реч

Оснивање Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (ИМГГИ) представљало је пионирски подухват увођења нових истраживања у области молекуларне биологије и молекуларне генетике и генетичког инжењерства. Од оснивања ИМГГИ је део међународне организације, Међународног центра за генетичко инжењерство и биотехнологију (ICGEB), која је под окриљем Организације уједињених нација за индустријски развој (UNIDO) окупила велики број земаља око исте идеје: да кроз улагање у науку и развој нових технологија допринесу њиховом бржем научном и економском развоју. Тренутно, 64 земље активно учествују у раду ове организације и неке од њих су, великим делом захваљујући улагањима у науку, прерасле у водеће економске земље света.

Дуга традиција, отвореност и визионарство учинили су да се у протеклих тридесет година у ИМГГИ образује и усавршава велики број младих научника. Данас Институт броји 104 запослена од тога 98 истраживача.

Главну акривност у ИМГГИ чине фундаментална истраживања, која се реализују и примењују у областима молекуларне генетике, биомедицине и биотехнологије. Институт од почетка улаже велике напоре да одржи корак са актуелним истраживањима у свету кроз улагања у истраживаче и улагања у нове технологије.

Поред тога, велика пажња се поклања раду са студентима, али и средњошколцима и најмлађим члановима наше заједнице који се по први пут на Институту су-срећу са лабораторијама, науком и једним сасвим другачијим начином размишљања.

Спој младости и нових идеја са једне стране и дугогодишњег искуства и експертизе са друге стране креира инспиративну средину за реализацију и најсмелијих идеја. Велика је част и срећа радити у окружењу паметних, амбициозних, храбрих и вредних људи који својим идејама доприносе да наш свакодневни живот буде бољи и квалитетнији. Изазови са којима се сусрећемо показали су нам да знање и вредности акумулиране деценијама у ИМГГИ имају изузетан свеопшти значај. Данас је више него очигледан утицај који наука, укључујући и молекуларну генетику, има на скоро сваки сегмент нашег живота. Истраживачи на Институту својим радом доприносе на најлепши могући начин развоју не само нашег друштва већ и развоју науке на глобалном нивоу.

ИМГГИ тежи да обезбеди адекватно окружење које омогућава да се учине кључни кораци у циљу повезивања фундаменталних истраживања и праксе. ИМГГИ ће наставити да подстиче развој иновативности и на тај начин додатно допринети општем друштвеном и економском развоју. Наше опредељење је да иновативни начин размишљања постане део опште културе што захтева сасвим нови начин образовања почевши од школске клупе па све до рада у лабораторији, али и константну комуникацију са широм друштвеном заједницом.

Начин на који ћемо искористити ове потенцијале као научна институција али и као друштво у целини дефинисаће добрим делом и нашу будућност. Улагање у науку није само улагање у садашњост већ пре свега улагање у будућност и генерације које долазе. То је наш задатак и наша одговорност.

## Foreword

The establishment of the Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE) was a pioneering venture to introduce new research within the field of molecular biology and molecular genetics and genetic engineering. Since its establishment IMGGE is part of an international organization, the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB). Under the auspices of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), the ICGEB has gathered a large number of countries who share the same goal: to encourage their rapid scientific and economic development through investments in science and new technologies. At the moment, 64 countries actively participate in cooperation with this organization, and some of them have, mostly due to investments in science, developed into the leading economic countries in the world.

A long tradition, openness to new ideas, and vision has made IMGGE a supportive environment for a large number of young scientists in the past 30 years. Today the institute has 104 employees and 98 of them are researchers.

The main activity in IMGGE is fundamental research, which is carried out and implemented in the fields of molecular genetics, biomedicine and biotechnology. From the very start, the Institute invested into those conducting research and new technologies in order to keep up with the current research trends in the world.

In addition, great attention is paid to working with university and high school students, as well as for the youngest members of our community. Working in laboratories, scientific research, and the different way of thinking makes a whole new experience for those involved.

Combination of youth and new ideas on one hand and the long-term experience and expertise on the other, creates an inspiring environment for realization of the boldest ideas. It is a great joy and honor to work with brilliant, ambitious, brave and hard-working people who invest their ideas into bettering the quality of our lives. Challenges we face show us that knowledge and values accumulated within IMGGE through the decades have an outstanding universal significance. The impact that science in general and molecular genetics in particular have on every aspect of our lives is quite obvious today. Researchers contribute their work in the best possible way to bring prosperity not only to our society, but to the development of science on a global level.

IMGGE aims to ensure a supportive environment for connecting fundamental research with practice. IMGGE will continue to encourage the development of the innovativeness thus making further contribution to the overall social and economic development. Our aim is to promote creative thinking and to support quality changes at all educational levels from primary school to university. Thus, a more productive communication with the broader community will be provided.

The way in which we act as a scientific institution and as a society will determine our future. Investing in science we not only invest in the present but also in the future, as well as the generations to come. All of this is our task and our responsibility.



## HISTORY

A historical overview of any field in life sciences encompasses not only mere sum of years devoted to a particular research and listing of exquisite scientists with astonishing achievements. It is of all crucial breakthroughs which profoundly impacted our general understanding of Nature and its fundamental laws.

Such breakthroughs in the fields of physiology, medicine and chemistry, represented milestones essential for the emergence and development of the new field of science - molecular biology, have been awarded with Nobel prizes for: the discovery of nucleic acids molecular structure and their fundamental role in transmission of the genetic information (1962), genetic control of enzymes and virus synthesis (1965), interpretation of the genetic code and its function in protein synthesis (1968), determination of base sequences in nucleic acids and for fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids - recombinant DNA (1980), discovery of mobile genetic elements (1983), development of Polymerase Chain Reaction (PCR) method (1993), deciphering molecular basis of the transcription of eukaryotic transcription (2006), and for mechanistic studies of DNA repair (2015).

Although these Nobel prizes were awarded in the field of physiology or medicine, and chemistry, what ties them together is molecular biology, science that integrates various disciplines of basic science as well as the application in medicine, pharmacy, agriculture, ecology and environmental protection. From a historical perspective, today is clear that molecular biology set the bases for many future scientific advances.

The onset of the molecular biology research in Serbia goes back to a group of young enthusiasts and visionaries (Vladimir Glišin, Ana Savić, Dragutin Savić as well as Ljubiša Topisirović and Radomir Crkvenjakov) led by Prof. Dušan Kanazir. Deeply understanding the potential of molecular biology in 1972 this pioneering group initiated a new Department at the Faculty of Natural Sciences (FNS) at the University of Belgrade - Molecular biology and physiology. They set the grounds for the establishment of the "Belgrade school" of molecular biology. In that way, it was possible to educate and to transfer the cutting edge knowledge to new generations of Serbian scientists which became recognized worldwide.

In the early eighties, the Belgrade group of researchers from the Institute for Biological Research "Siniša Stanković" (IBISS), Institute of Nuclear Sciences "Vinča", as well as Laboratory for Genetical Engineering at the Institute "Galenika" started a pioneer job - gene cloning experiments in the local scene. In 1983, a group from the IBISS cloned bacterial genes for penicillin amidase in *E. coli* and then researchers at "Galenika" cloned, for the first time in the former Yugoslavia, a human gene - the gene for beta-interferon. Also, the first partial DNA sequences of rat alpha and beta globin genes in the world were revealed.

These remarkable results, as well as the willingness of researchers educated in Belgrade and at prestigious international universities to face challenges of molecular biology and molecular genetics, defined the right moment for the establishment of scientific institution that will keep up with global scientific trends. Therefore, in 1986 The Center for Genetic Engineering, today known as Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering – IMGGE was founded.

After the former Yugoslav Federal Assembly adopted the Law on Ratification of the Statute of the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) IMGGE was founded as Affiliated Centre of ICGEB. Yugoslavia was one of conceptual creators of the idea to establish an organization like this at an international level. The first Conference on the establishment of ICGEB under the patronage of United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) was held in Belgrade in 1982. Following this idea, in 1983 UNIDO assembled The Exploratory Committee with five members were Europe was represented by Prof. Vladimir Glišin, and Trieste, Italy was selected to be a seat of ICGEB.

Today ICGEB encompasses 64 full Member States. Since its foundation, IMGGE has actively been participating in the work of the highest organ of ICGEB – Board of Governors. Serbia is represented by a Governor and Liaison Officer (generally Director of IMGGE). Thanks to active participation in the work of ICGEB, 40 researchers from Serbia attended the doctoral and post-doctoral studies at ICGEB centers and 230 researchers participated in courses organized by ICGEB. Also, 23 Collaborative Research Projects (CRP) were financed by ICGEB. In 2005, IMGGE organized the course "Molecular diagnosis of human diseases" within the program of practical and theoretical courses of ICGEB with participations of researchers from 9 countries.

As Prof. Vladimir Glišin said: "Here I also want to pay special appreciation to the political establishment of Serbia at the time, for understanding the importance of these scientific breakthroughs. In particular, I would like to emphasize that the full financial support for the building construction as well as for full infrastructure of the IMGGE was provided by the Republic Association for Science of the Socialist Republic of Serbia. Now, 30 years after foundation of the IMGGE, I have the honor, privilege, and satisfaction to conclude that the investment was not in vain as you will see yourself in the chapters of the book that follow."



## ИСТОРИЈАТ

Историјат неке научне области природних наука нису само године и важни појединци, то су пре свега они преломни пробоји у сазнању који су променили поимање природе и разумевање њених законитости.

Врхунски стручњаци приликом додела Нобелових награда имали су осећај да процене који су то пробоји: 1962. године – откриће молекуларне структуре нуклеинских киселина као молекула који преносе наследну информацију у живим организмима; 1965. године – генетичка контрола синтезе ензима и вируса, 1968. године – разумевање улоге генетичког кода у синтези протеина, 1980. године – секвенцирање и биохемија нуклеинских киселина (рекомбинантна ДНК), 1983. године – откриће мобилних генетичких елемената, 1993. године – ланчана реакција полимеразе (PCR), 2006. године – откриће молекуларне основе транскрипције код еукариота, 2015. године – механистичка анализа поправке оштећења на нивоу ДНК. Иако су ове награде додељиване за истраживања у области физиологије или медицине, односно хемије, оно што их обједињује је МОЛЕКУЛАРНА БИОЛОГИЈА, наука чији се продори одсликавају и на многе друге науке, како основне, тако и на примену молекуларних метода у медицини, фармацији, пољопривреди, екологији и заштити животне средине. Домети молекуларне биологије постају јасни „са историјске дистанце” и дају темеље за сва будућа научна достигнућа.

Почеци молекуларне биологије у нашој земљи везују се за ентузијасте и визионаре (Владимир Глишин, Ана Савић, Драгутин Савић, нешто касније и Љубиша Тописировић и Радомир Црквењаков) предвођене проф. др Душаном Каназиром који су, схвативши светске трендове и потенцијал молекуларне биологије, иницирали 1972. године оснивање студијске групе Молекуларна биологија и физиологија на Природно-математичком факултету Универзитета у Београду. Тако је формирана „Београдска школа”. Она ће изнедрити велики број младих научника који ће постати препознатљиви у читавом свету.

Почетком осамдесетих година прошлог века истраживачи из Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” (ИБИСС), Института за нуклеарне науке „Винча”, као и Лабораторије за генетичко инжењерство при Институту „Галеника”, започињу пионирске експерименте клонирања гена на домаћој сцени. Године 1983, група из ИБИСС-а је клонирала бактеријски ген за пеницилин амидазу у *E. coli*, а потом је у Галеници, први пут у некадашњој Југославији, клониран хумани ген – ген за бета-интерферон и добијена је, прва у свету, парцијална секвенца ДНК алфа и бета глобинског гена пацова.

На основу постигнутих резултата истраживача школованих у Београду, али и на престижним светским универзитетима, као и њихове спремности да се ухвате укоштац са савременим методама молекуларне биологије и молекуларне генетике, било је јасно да су се стекли услови за формирање специјализоване научне институције која ће се укључити у светске трендове. Тако је 1986. године основан Центар за генетичко инжењерство, касније преименован у Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство – ИМГТИ.

Југословенска делегација на састанку Припремног комитета UNIDO у Бечу 1984. године Владимир Глишин, Мирослав Спасојевић, Петар Живадиновић

Yugoslav delegation at UNIDO Preparatory Committee meeting in Vienna 1984 Vladimir Glišin, Miroslav Spasojević, Petar Živadinović



ИМГТИ је основан као придружени центар Међународног центра за генетичко инжењерство и биотехнологију (International Center for Genetic Engineering and Biotechnology – ICGEB) на основу Закона о ратификацији статута ICGEB коју је 1986. године усвојила Савезна скупштина СФРЈ. Ондашња Југославија је била један од идејних оснивача ICGEB-а те је прва конференција о оснивању ICGEB под патронатом United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) одржана у Београду 1982. године. Држећи се ове идеје, почетком 1983. године UNIDO је формирао петочлани Истражни комитет у коме је Европу представљао проф. др Владимир Глишин. Комитет је једногласно препоручио град Трст у Италији као седиште ICGEB-а.

Данас ICGEB има 64 пуноправне државе чланице. Од самог оснивања ICGEB-а представници Србије, гувернер и официр за везу (по правилу, директор ИМГТИ) активно учествују у раду Савета гувернера, највишег органа ICGEB-а.

Захваљујући активном учешћу у раду ICGEB-а до сада је 40 истраживача из Србије похађало докторске и постдокторске студије у ICGEB центрима, а 230 истраживача је учествовало на курсевима које организује ICGEB. Такође, финансирана су 23 пројекта у сарадњи са ICGEB-ом. ИМГТИ је 2005. године организовао курс „Молекуларна дијагностика хуманих болести“ у оквиру програма практичних и теоријских курсева ICGEB-а коме су присуствовали учесници из 9 земаља.

Непосредни актер ових дешавања, проф. др Владимир Глишин, наглашава: „Овде такође хоћу да одам посебну захвалност политичком естаблишменту Србије у оно време, за разумевање значаја ових научних продора. Посебно овде мора да се истакне да је комплетну финансијску подршку, како за саму зграду, тако и за одговарајућу инфраструктуру Института, обезбедила Републичка заједница науке Социјалистичке Републике Србије. Сада, 30 година од оснивања нашег Института, ја имам част, привилегију и задовољство да закључим да ова инвестиција није била узалудна, као што можете и сами да се уверите у поглављима која следе у овој монографији“.



First laboratories and projects leaders at IMGGE were professors from Faculty of Biology, University of Belgrade.

In the course of time scientific themes evolved and new laboratories emerged in IMGGE.

#### Laboratory for Molecular Biomedicine (LMBm)

(previously Laboratory for Molecular Hematology)

Zvezdana Popović, PhD, 1996–1999

Jelena Zarić, PhD, 1999–2000

Branka Zukić, PhD, 2013–2015

Sonja Pavlović, PhD, 2000–2013, 2015–

#### Laboratory for Genetic Engineering of Microorganisms

Miroslav Konstantinović, PhD, 1996–2000

#### Laboratory for Molecular Genetics of Prokaryotes

Prof. Dragutin Savić 1986–1998

#### Laboratory for Molecular Biology (LMB)

Prof. Ana Savić 1986–2002

Dragana Stefanović, PhD, 2002–2005

Snežana Kojić, PhD, 2005–2010

Dragica Radojković, PhD, 2010–

#### Laboratory for Human Molecular Genetics (LHMG)

academician Milena Stevanović, PhD, 1994–

#### Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology (LMMGE)

(previously Laboratory for Molecular Genetics of Actinomycetes)

Branka Vasiljević, PhD, 1998–

#### Laboratory for Molecular Microbiology (LMM)

(previously Laboratory for Molecular Genetics of Industrial Microorganisms)

Prof. Ljubiša Topisirović 1986–2011

Milan Kojić, PhD, 2011–2015

Jelena Begović, PhD, 2015–

#### Laboratory for Molecular Biotechnology

Goran Ljubijankić, PhD, 1996–2003

#### Laboratory for Molecular Biology of Plants (LMBP)

Vesna Maksimović, PhD, 2002–2012

Jelena Samardžić, PhD, 2012–

Први тим који је руководио лабораторијама и пројектима у оквиру ИМГГИ од самог оснивања чинили су професори Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Како се научна проблематика којом се бави ИМГГИ развијала, временом су настајале и нове лабораторије.

#### Лабораторија за молекуларну биомедицину (ЛМБм)

(ранији назив Лабораторија за молекуларну хематологију)

др Звездана Поповић 1996–1999

др Јелена Зарић 1999–2000

др Бранка Зукић 2013–2015

др Соња Павловић 2000–2013, 2015–

#### Лабораторија за генетичко инжењерство микроорганизама

др Мирослав Константиновић 1996–2000

#### Лабораторија за молекуларну генетику прокариота

проф. др Драгутин Савић 1986–1998

#### Лабораторија за молекуларну биологију (ЛМБ)

проф. др Ана Савић 1986–2002

др Драгана Стефановић 2002–2005

др Снежана Којић 2005–2010

др Драгица Радојковић 2010–

#### Лабораторија за хуману молекуларну генетику (ЛХМГ)

академик др Милена Стевановић 1994–

#### Лабораторија за молекуларну генетику и екологију микроорганизама (ЛМГЕМ)

(ранији назив Лабораторија за молекуларну генетику актиномицета)

др Бранка Васиљевић 1998–

#### Лабораторија за молекуларну микробиологију (ЛММ)

(ранији назив Лабораторија за молекуларну генетику индустријских микроорганизама)

проф. др Љубиша Тописировић 1986–2011

др Милан Којић 2011–2015

др Јелена Беговић 2015–

#### Лабораторија за молекуларну биотехнологију

др Горан Љубијанкић 1996–2003

#### Лабораторија за молекуларну биологију биљака (ЛМББ)

др Весна Максимовић 2002–2012

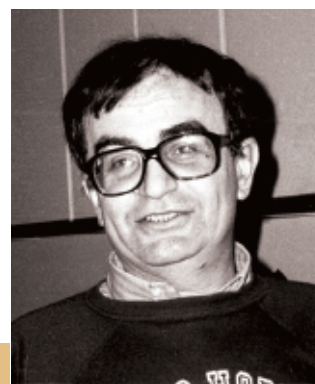
др Јелена Самарџић 2012–



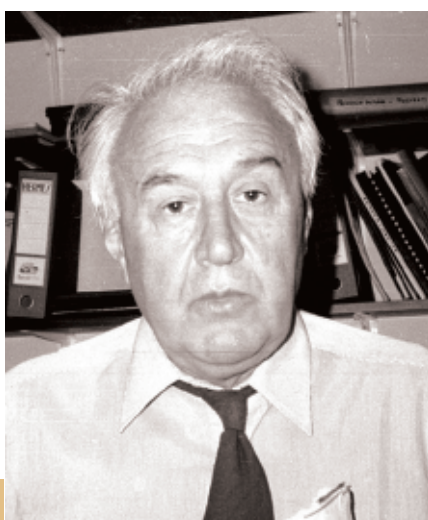
Први тим истраживача који су водили лабораторије и пројекте у ИМГГИ  
The first team of group and project leaders of IMGGE



проф. др Ана Савић  
Prof. Ana Savić



проф. др Драгутин Савић  
Prof. Dragutin Savić



проф. др Владимир Глишин  
Prof. Vladimir Glišin



проф. др Радомир Црквењаков  
Prof. Radomir Crkvenjakov



проф. др Љубиша Тописировић  
Prof. Ljubiša Topisirović



## Директори ИМГГИ Directors of IMGGE



проф. др Владимир Глишин  
оснивач и први директор ИМГГИ 1986–1988, 1990–1995  
Prof. Vladimir Glišin  
founder and first director of IMGGE 1986–1988, 1990–1995



др Звездана Поповић  
1989–1990, 1996–1999  
Zvezdana Popović, PhD  
1989–1990, 1996–1999



проф. др Љубиша Тописировић  
1988–1989, 2011–2013  
Prof. Ljubiša Topisirović  
1988–1989, 2011–2013



др Бранка Васиљевић  
1999–2010  
Branka Vasiljević, PhD  
1999–2010



др Јелена Беговић  
2013–  
Jelena Begović, PhD  
2013–

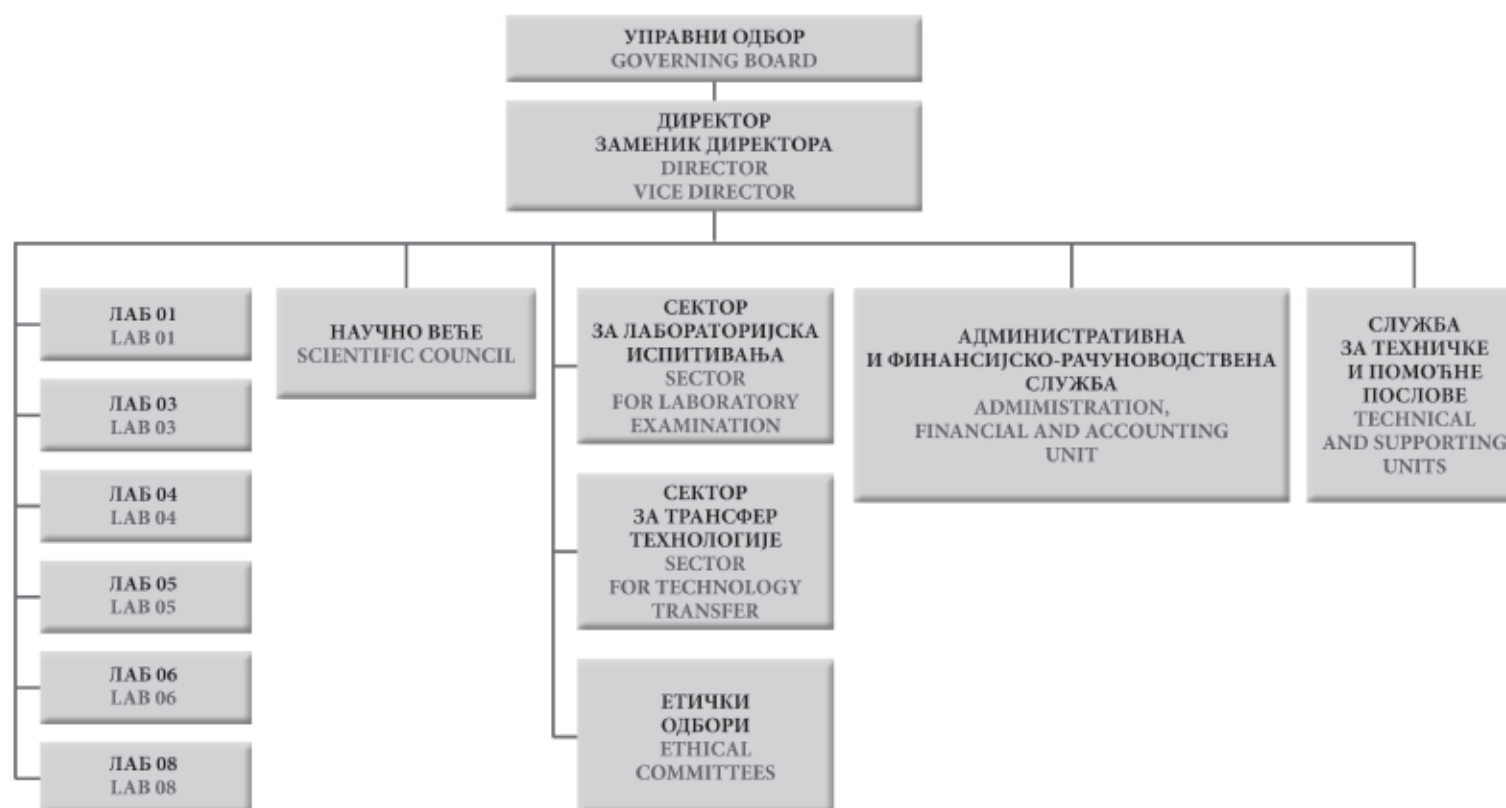




# Организација Organization

## Управни одбор

- Проф. др **Славиша Станковић**, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, председник
- др **Гордана Никчевић**, научни саветник, Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитет у Београду, заменик председника
- Проф. др **Марина Миленковић**, редовни професор, Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, члан
- др **Соња Вељовић Јовановић**, научни саветник, Институт за мултидисциплинарна истраживања, Београд, члан
- др **Милан Којић**, научни саветник, Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, члан
- др **Драгица Радојковић**, научни саветник, Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, члан
- др **Горан Тодоровић**, научни саветник, Институт за кукуруз „Земун Поље”, Београд, члан



## Board

- Prof. **Slaviša Stanković**, Associate Professor, Faculty of Biology, University of Belgrade, President
- **Gordana Nikčević**, PhD, Principal Research Fellow, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vice President
- Prof. **Marina Milenković**, Full Professor, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, member
- **Sonja Veljović Jovanović**, PhD, Principal Research Fellow, Institute for Multidisciplinary Research, Belgrade, member
- **Milan Kojić**, PhD, Principal Research Fellow, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, member
- **Dragica Radojković**, PhD, Principal Research Fellow, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, member
- **Goran Todorović**, PhD, Principal Research Fellow, Maize Research Institute "Zemun Polje", Belgrade, member

**Acting Director**

**Jelena Begović**, PhD, Senior Research Associate

**Acting Vice Director**

**Ivana Strahinić**, PhD, Principal Research Fellow

**Scientific Council****President**

**Gordana Nikčević**, PhD, Principal Research Fellow, president

**Members**

akademician **Milena Stevanović**, PhD, Principal Research Fellow

**Branka Vasiljević**, PhD, Principal Research Fellow

**Sonja Pavlović**, PhD, Principal Research Fellow

**Dragica Radojković**, PhD, Principal Research Fellow

**Vesna Maksimović**, PhD, Principal Research Fellow

**Milan Kojić**, PhD, Principal Research Fellow

**Ivana Strahinić**, PhD, Principal Research Fellow

**Nataša Golić**, PhD, Principal Research Fellow

**Jelena Begović**, PhD, Senior Research Associate

**Snežana Kojić**, PhD, Senior Research Associate

**Branka Zukić**, PhD, Senior Research Associate

**Jelena Samardžić**, PhD, Research Associate

**Nataša Kovačević Grujičić**, PhD, Research Associate, Vice President

**Ivana Morić**, PhD, Research Associate, Vice President

**Marija Mojsin**, PhD, Research Associate

**Jelena Kušić Tišma**, PhD, Research Associate

**Jelena Popović**, PhD, Research Associate

**Ljiljana Rakićević**, PhD, Research Associate

**Ethics Committee**

**President, Valentina Djordjević**, PhD, Senior Research Associate

**Ethics Committee for the protection of experimental animals**

**President, Aleksandra Divac Rankov**, PhD, Research Associate

**Sector for laboratory examinations**

**Head, Branko Tomić**, PhD, Research Associate

**Sector for Technology Transfer**

**Head, Nataša Golić**, PhD, Principal Research fellow

**Administration, Financial and Accounting Unit**

**Violeta Evtov**, Secretary of the Institute

**Maja Jevtić**, Head of financial and accounting unit

**Duško Vujić**, Independent officer for material, financial and accounting tasks

**Milica Pecold**, Accounting clerk

**Matija Klikovac**, Procurement officer

**Technical and Supporting Unit**

**Mladen Čujić**, Technical support and person for safety and health at work

**Nikola Ilić**, IT support

**Hygienists**

**Bojana Rabljenović, Svetlana Jeremić, Milojka Pantić, Nemanja Matijević**



**В. д. директора**др **Јелена Беговић**, виши научни сарадник**Заменик в. д. директора**др **Ивана Страхинић**, научни саветник**Научно веће****Председник**др **Гордана Никчевић**, научни саветник, председник**Чланови**

академик др **Милена Стевановић**, научни саветник  
 др **Бранка Васиљевић**, научни саветник  
 др **Соња Павловић**, научни саветник  
 др **Драгица Радојковић**, научни саветник  
 др **Весна Максимовић**, научни саветник  
 др **Милан Којић**, научни саветник  
 др **Ивана Страхинић**, научни саветник  
 др **Наташа Голић**, научни саветник  
 др **Јелена Беговић**, виши научни сарадник  
 др **Снежана Којић**, виши научни сарадник  
 др **Јелена Самарџић**, научни сарадник  
 др **Наташа Ковачевић Грујичић**, научни сарадник, заменик председника  
 др **Ивана Морић**, научни сарадник, заменик председника  
 др **Марија Мојсин**, научни сарадник  
 др **Јелена Кушић Тишма**, научни сарадник  
 др **Јелена Поповић**, научни сарадник  
 др **Бранка Зукић**, виши научни сарадник  
 др **Љиљана Ракићевић**, научни сарадник

**Етички одбор**Председник, др **Валентина Ђорђевић**, виши научни сарадник**Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња**Председник, др **Александра Дивац Ранков**, научни сарадник**Сектор за лабораторијска испитивања**Руководилац, др **Бранко Томић**, научни сарадник**Сектор за трансфер технологије**Руководилац, др **Наташа Голић**, научни саветник**Административна и финансијско-рачуноводствена служба****Виолета Евтов**, секретар Института**Маја Јевтић**, руководилац финансијско-рачуноводствене службе**Душко Вујић**, самостални референт материјално-финансијских и обрачунских послова**Милица Пецолд**, референт за административне, кадровске и финансијске потребе**Матија Кликовац**, самостални референт за набавке**Служба за техничке и помоћне послове****Младен Чујић**, техничка подршка и лице за безбедност и здравље на раду**Никола Илић**, ИТ подршка**Лаборанти-хигијеничари****Бојана Рабљеновић**, **Светлана Јеремић**, **Милојка Панџић**, **Немања Матијевић**



Истраживања у ЛМБм су започела изучавањем молекуларне основе наследних анемија и хематолошких малигнитета. Временом се активности ЛМБм проширују на велики број тема из области биомедицине, једне од најактуелнијих области истраживања у 21. веку. Истраживања су усмерена на расветљавање молекуларне основе одабраних ретких болести, и то кроз дизајнирање модела који предвиђају развој болести на основу генетичког профила и животних навика (Кронова болест), савремену молекуларну дијагностику и модификацију терапијских протокола за дечје и адултне хематолошке малигнитете (фармакогеномика), рутинску примену секвенцирања нове генерације (NGS, енгл.) за дијагностику ретких болести, као и развој регенеративне медицине применом матичних ћелија. ЛМБм је препозната у Србији и региону по најмодернијим дијагностичким методама које су стављене у службу здравља. Данас су напори ЛМБм усмерени ка транслационој медицини, са циљем да се у здравственом систему примени персонализована медицина заснована на геному пацијента.

Research at LMBm had begun with studies of the molecular basis of hereditary anemia and hematological malignancies. Over time, activities of LMBm have broadened to a great number of topics from biomedicine field, one of the most current research areas of the 21<sup>st</sup> century. Research is focused on resolving the molecular basis of selected rare diseases through: designing models that predict the disease outcome based on genetic profile and lifestyle (Chron's disease), modern molecular diagnostics and modification of therapeutic protocols for child and adult hematological malignancies (pharmacogenomics), routine use of Next Generation Sequencing (NGS) technology for rare diseases diagnostics, as well as the development of regenerative medicine using stem cells. LMBm is recognizable in Serbia and the region by the most modern diagnostic methods, which were put at the service of healthcare. Today, LMBm moves forward to translational medicine, aiming to bring the personalized medicine to the healthcare system.

## Лабораторија за молекуларну биомедицину Laboratory for Molecular Biomedicine



др Гордана Никчевић  
научни саветник  
Gordana Nikčević, PhD  
Principal Research Fellow



**Руководилац**  
др Соња Павловић  
научни саветник  
**Head**  
Sonja Pavlović, PhD  
Principal Research Fellow



др Маја Стојиљковић  
виши научни сарадник  
Maja Stojiljković, PhD  
Senior Research Associate



др Бранка Зукић  
виши научни сарадник  
Branka Zukić, PhD  
Senior Research Associate



др Наташа Тошић  
виши научни сарадник  
Nataša Tošić, PhD  
Senior Research Associate



др Милена Угрин  
научни сарадник  
Milena Ugrin, PhD  
Research Associate



др Весна Спасовски  
научни сарадник  
Vesna Spasovski, PhD  
Research Associate



др Татјана Костић  
научни сарадник  
Tatjana Kostić, PhD  
Research Associate



др Биљана Станковић  
научни сарадник  
Biljana Stanković, PhD  
Research Associate



др Никола Котур  
научни сарадник  
Nikola Kotur, PhD  
Research Associate



др Кристел Клаасен  
научни сарадник  
Kristel Klaassen, PhD  
Research Associate



др Сања Срзентић  
научни сарадник  
Sanja Srzentić, PhD  
Research Associate



др Јелена Костић  
истраживач-сарадник  
Jelena Kostić, PhD  
Research Assistant



Ирена Марјановић  
истраживач-сарадник  
Irena Marjanović, MSc  
Research Assistant



Анита Скакић  
истраживач-сарадник  
Anita Skakić, MSc  
Research Assistant



Марина Анђелковић  
истраживач-сарадник  
Marina Anđelković, MSc  
Research Assistant



др Владимир Гашић  
истраживач-приправник  
Vladimir Gašić, MD  
Research Trainee



Миша Врећа  
истраживач-сарадник  
Miša Vreća, MSc  
Research Assistant



Јована Васиљевић  
истраживач-сарадник  
Jovana Vasiljević, MSc  
Research Assistant



## Research focus

Laboratory for Molecular Biomedicine (LMBm) was founded as the Laboratory for Molecular Hematology (LMH), in which the first research activities were focused on molecular basis of hereditary anemia. Using a (b/b) rat model system, research was focused on regulation of globin genes expression. Simultaneously, research in the gene therapy field started, when mammalian cell culture was successfully infected with defective retroviral vectors. Also, constitutive expression of human recombinant  $\beta$ -interferon from a retroviral vector enabled the study of its gene expression regulation mechanism. Afterwards, the permanent hematopoietic cell lines were successfully transduced with defective retroviral vectors, demonstrating that the produced viruses can be used for hematopoiesis stem cells transduction.

The end of the 90s signifies a transition moment, when research team started a pioneer work on forming a new LMH, setting the base for new research topics in the field of biomedicine. First studies on hematological malignancies used molecular genetic markers in diagnostics, prognosis and monitoring of all types of leukemias, which remain the hallmark of the Laboratory. Research was broadened with studies on molecular basis of phenylketonuria and inflammatory bowel diseases, which led to better understanding of etiology and genotype-phenotype correlation of these diseases. It is important to note that during this period LMH started its first research in the field of pharmacogenomics in Serbia. Obtained results led to changes in protocols of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment, regarding thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) genotype. Alongside scientific research, LMH becomes recognizable in Serbia and the region by a diverse range of modern diagnostic methods, which were first introduced in this laboratory and put at the service of health-care.

After year 2010, research interests of LMH opened a number of new research chapters in biomedicine, with rare diseases being their common denominator. In regard to the growing number of new scientific topics, laboratory changed its name to the Laboratory for Molecular Biomedicine in 2013. Research interest of LMBm for different human molecular pathologies was constantly growing, and new research goals were established. Hematologic malignancies remained one of the main foci of LMBm, including research on multiple myelomas and lymphomas, whereas in leukemia research new markers for the diagnosis, prognosis and disease progression monitoring were targeted. The research on thalassemias and phenylketonuria continued, and research on various monogenic metabolic disorders was initiated (organic acidemias, glycogen storage diseases etc). For inflammatory bowel diseases, novel inflammation and apoptosis markers were examined. Pharmacogenetics of thiopurine drugs continued through the analysis of new pharmacogenetic markers. Furthermore, a completely new scientific topic started - shedding light on the molecular basis of Perthes disease. Also, research of other rare diseases, such as celiac disease, congenital adrenal hyperplasia and Gilbert's syndrome started. The molecular genetic basis of these diseases were examined, and mutational spectrum for Serbia was established. This resulted in the introduction of new diagnostic tests. It is important to note that, in this period LMBm launched the first research in the field of regenerative medicine. A new approach in treatment of bone and cartilage diseases based on stem cells was studied. Cultivation and propagation of mesenchymal stem cells and detection of markers characteristic for osteoblasts and chondroblasts led to the implementation of stem cells in orthopedics, and today clinical study is in its final stage. Ultimate goals of LMBm are directed towards the translational biomedicine, aiming to bring the personalized medicine, based on patient's genome, to the healthcare system.

Various aspects of the rare diseases studies became the focus of LMBm projects, with the national project being among the most important ones. It dealt with the molecular pathophysiology, diagnostic and therapeutic modalities of rare diseases, while successful cooperation with experts in the fields of law and bioethics contributed to social, ethical and legal aspects of study. Extremely fruitful cooperation with renowned health institutions in Serbia and the Balkans has contributed to application of acquired scientific knowledge in order to constantly improve medical practice by introducing molecular genetics diagnosis of genetic disorders and malignancies. Therefore, LMBm became a unique place in the Balkans for many genetic tests, using the latest molecular genetics approaches which are essential for accurate diagnosis, choice of treatment, prognosis and successful monitoring of the disease. In addition to collaborations in the region, LMBm has also established successful collaborations with distinguished centers and top scientists from the European Union countries, which resulted in joint publications and partnerships on important projects. LMBm became recognized as a regional expert center for rare diseases, which resulted in REGPOT FP7 European project. This project has enabled the reinforcement of biomedical sciences through strengthening the research potential for the study of rare diseases in Serbia. Samples of a wide variety of human pathologies were collected, and biobanks were formed, representing the cornerstone for all future research. Owing to this project, IMGGE has acquired the most modern equipment, enabling the implementation of the state-of-the-art technologies such as Next Generation Sequencing (NGS) in research and diagnostics of rare diseases.

Alongside research work and expertise in rare diseases diagnostics, LMBm actively participates in education of newcomers at University of Belgrade, especially through realization of multidisciplinary doctoral theses. Today, LMBm consist of 14 PhDs who grew out right in this Laboratory, and 5 PhD students. Especially important activity of LBM is popularization and promotion of science, which started with the project "Short Course of DNAlogy", aimed to disseminate knowledge of molecular biology through "hands-on" experiments. Furthermore, LMBm team actively participates in all manifestations popularizing science, such as Science Festival and Researchers' Night.



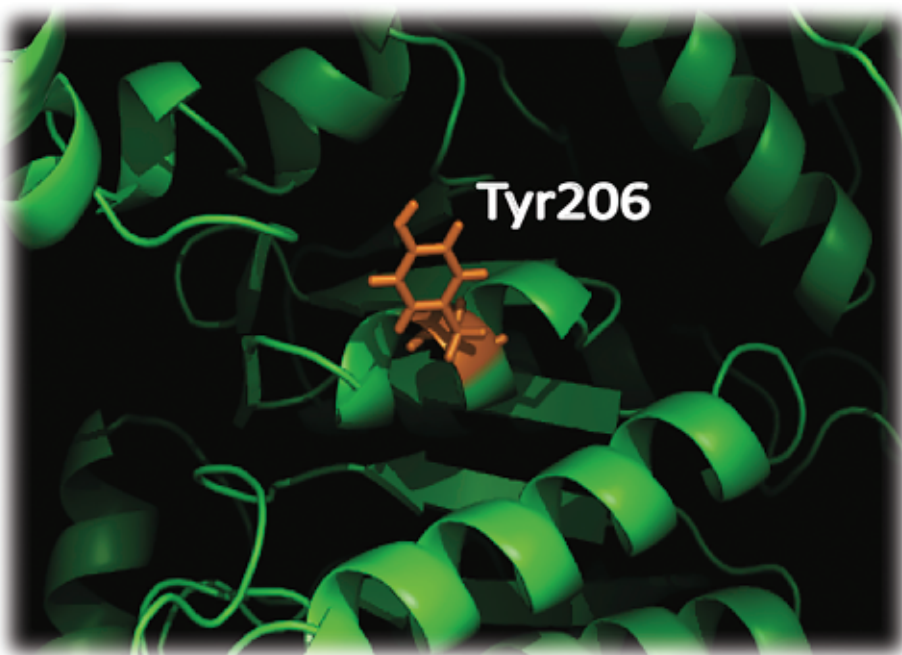
## Фокус истраживања

Лабораторија за молекуларну биомедицину (ЛМБм) је основана као Лабораторија за молекуларну хематологију (ЛМХ), у којој су прве истраживачке активности биле усмерене на молекуларну основу наследних анемија. Као модел систем коришћен је (б/б) пацов, на коме је изучавана регулација експресије глобинских гена. Започета су и истраживања на пољу генске терапије, када су сисарске ћелије у култури успешно инфициране дефектним ретровирусним векторима, док је конститутивна експресија хуманог рекомбинованог  $\beta$ -интерферона омогућила проучавање механизма регулације експресије овог гена са ретровирусног вектора. Потом су дефектним ретровирусима успешно трансдуковане перманентне линије хематопоеетских ћелија, чиме је показано да се произведени вируси могу користити за трансдукцију матичних ћелија хематопоезе.

Крај деведесетих година двадесетог века означио је прелазни моменат када истраживачки тим започиње пионирски рад на формирању нове ЛМХ, у којој је утемељена нова научна проблематика из области биомедицине, којом се лабораторија и данас бави. У овом периоду су започета прва истраживања из области хематолошких малигнитета применом молекуларногенетичких маркера у дијагностици, прогнози и праћењу свих типова леукемија, по чему је лабораторија и данас препознатљива. Поред тога, отпочета

су истраживања молекуларне основе фенилкетонурије као и запаљенских болести црева код човека, која су водила бољем разумевању етиологије болести и генотип-фенотип корелације. Важно је истаћи да су у ЛМХ покренута и прва истраживања из области фармакогенетике у Србији. Добијени резултати довели су до измена у протоколу лечења дечјих акутних лимфобластних леукемија, који одговарају генотипу тиопурин-С-метилтрансферазе (ТРМТ, енгл.). Упоредо са научноистраживачким радом, ЛМХ током година постаје препознатљива у Србији и региону по разноврсном дијапазону најмодернијих дијагностичких метода које су први пут уведене у овој лабораторији и стављене у службу здравља.

Након 2010. године, научноистраживачки интереси ЛМХ се шире, освајајући нове области у биомедицини, али свој заједнички имену налазе у ретким болестима. С обзиром на растући број нових научних тематика, лабораторија 2013. године мења име у Лабораторија за молекуларну биомедицину (ЛМБм). Истраживачко интересовање ЛМБм за различите хумане молекуларне патологије непрекидно је расло, отварајући низ нових истраживачких проблематика. Иако хематолошки малигнитети остају једно од главних истраживачких фокуса ЛМБм поље истраживања се шири и на мултипле мијеломе и лимфоме, док се у области леукемија ради на новим маркерима у дијагностици, прогнози и праћењу тока болести. Истраживање на таласемијама и фенилкетонурији проширено је на низ



Тростандардни молекуларни модел који приказује мутирани регион протеина  
Three-dimensional molecular model of a protein with close-up view of the region harboring novel pathogenic variant

моногенских метаболичких болести (органске ацидемије, гликогенозе итд). На пољу запаљенских болести црева испитивани су нови маркери инфламације и апоптозе. Фармакогенетика тиопуринских лекова је настављена кроз анализу нових фармакогенетичких маркера. Осим тога, започета је и потпуно нова научна проблематика - расветљавање молекуларне основе Пертесове болести. Отпочела су истраживања молекуларногенетичке основе и других ретких болести, као што су целијачна болест, конгенитална адренална хиперплазија и Жилберов синдром, за које је утврђен мутациони спектар за Србију, што је резултовало увођењем дијагностичких тестова. Важно је истаћи да су у овом периоду у ЛМБм покренута прва истраживања из области регенеративне медицине. Изучаван је нови приступ у лечењу болести костију и хрскавице базиран на матичним ћелијама. Култивација и пропација мезенхимских матичних ћелија и детекција маркера карактеристичних за остеобласте и хондробласте довели су до примене матичних ћелија у ортопедији, а клиничка студија је у завршној фази. Крајњи напори ЛМБм су усмерени ка транслационој биомедицини, са циљем да се у здравственом систему примени персонализована медицина заснована на личном геному пацијента.

Различити аспекти изучавања ретких болести постају фокус пројеката ЛМБм, међу којима се истиче национални пројекат, који се бавио молекуларном патофизиологијом, дијагностичким и терапијским модалитетима ретких болести, док је, са друге стране, успешна сарадња са стручњацима из области права и биоетике допринела да се истраже и социјални, етички и правни аспекти. Изузетно плодна сарадња са еминентним здравственим установама у Србији и Балкану допринела је да се стечена научна знања примењују за стално унапређивање медицинске праксе увођењем молекуларногенетичке дијагностике генетичких поремећаја и малигнитета. ЛМБм тако постаје јединствено место на Балкану за многа генетичка тестирања, коришћењем најновијих



## Specificities of some research interests of LMBm

### Rare hereditary diseases

Rare, hereditary diseases represent a heterogeneous group of diseases characterized by inadequately studied pathogenesis and diagnostics protocols. In LMBm, genetic bases of several rare diseases in Serbia was studied, including thalassemias, phenylketonuria, organic acidurias, glycogen storage diseases etc. Methodologies for mutation detection were optimized, therefore making basis for molecular diagnostics, while novel genetic variants were functionally characterized. Introduction of NGS led to broadening the spectrum of rare diseases that can be diagnosed in LMBm.

### Hematological malignancies

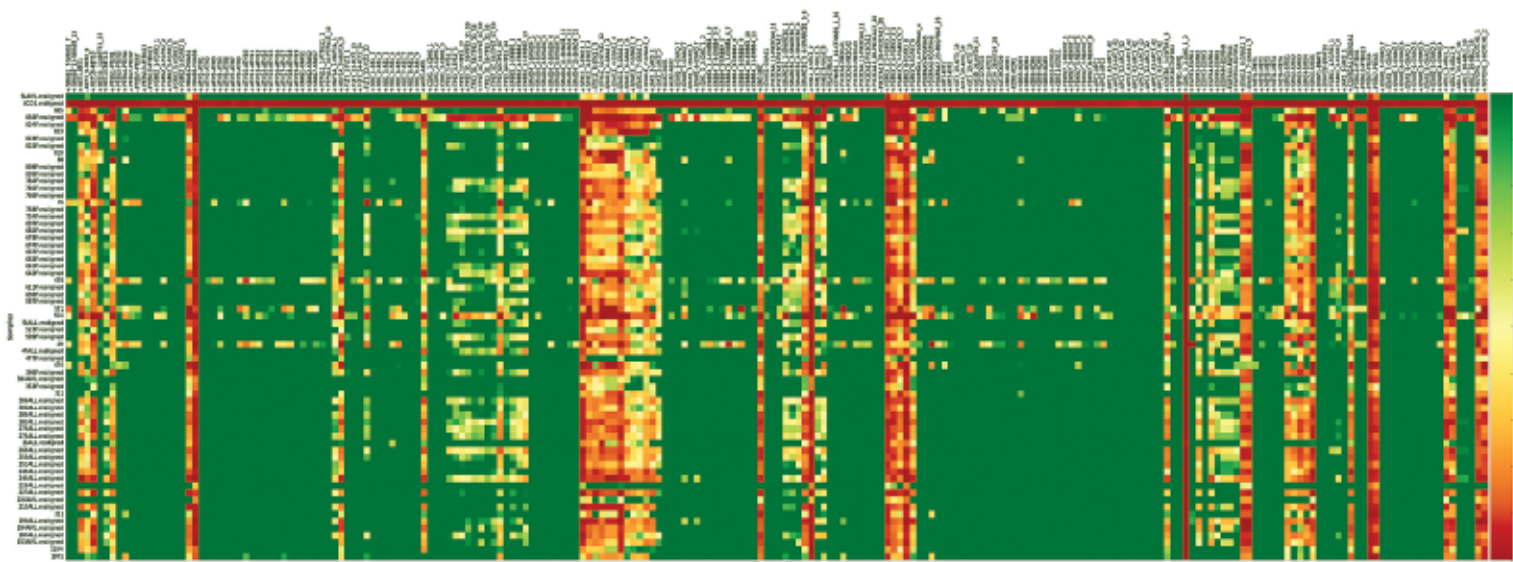
The understanding of leukemia, lymphoma and multiple myeloma pathophysiology has rapidly advanced due to molecular genetics studies. For the first time in Serbia, the methodology used to detect genetic changes associated with pathogenesis of these malignancies was optimized in LMBm. These analyses are important for proper diagnostics, minimal residual disease detection and prognosis of patients with hematological malignancies. LMBm research focus includes alterations in cell differentiation, proliferation and apoptosis processes, studied via mutation detection and measuring molecular markers expression levels, as well as detection of novel markers.

### Pharmacogenomics

Pharmacogenomics analyzes relation between genetic variants and therapy response in order to increase drug efficacy and decrease side effects. First pharmacogenomics studies in LMBm dealt with TPMT gene variants, important for thiopurine therapy personalization. For the first time in Serbia, clinically relevant TPMT gene variants detection was introduced in LMBm. Based on pharmacogenomics study of Serbian patients, it was shown that in heterozygous carriers of clinically relevant TPMT variants, therapeutic protocols should be altered by lowering thiopurine drugs doses. Pharmacogenomics potential of non-coding variants, as well as thiopurine therapy influence on TPMT gene expression level, was also studied in LMBm. The results showed that thiopurine therapy influences TPMT gene expression in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. Currently, research focus includes other genetic variants relevant for thiopurine, methotrexate and glucocorticoid therapy individualization aiming to enhance therapeutic protocols for acute lymphoblastic leukemia.

### Inflammatory bowel diseases

Inflammatory bowel diseases, Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic relapsing inflammatory disorders of gastrointestinal tract characterized by genetic heterogeneity and incomplete penetrance. In LMBm, associations between variants in *NOD2*, *TLR4*, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  and *IL-1RN* genes and inflammatory bowel diseases were investigated for the first time in Serbia. Obtained genetic information



Анализа генетичких профила пацијената добијених методом секвенцирања нове генерације  
Analysis of patients' genetic profiles after next generation sequencing



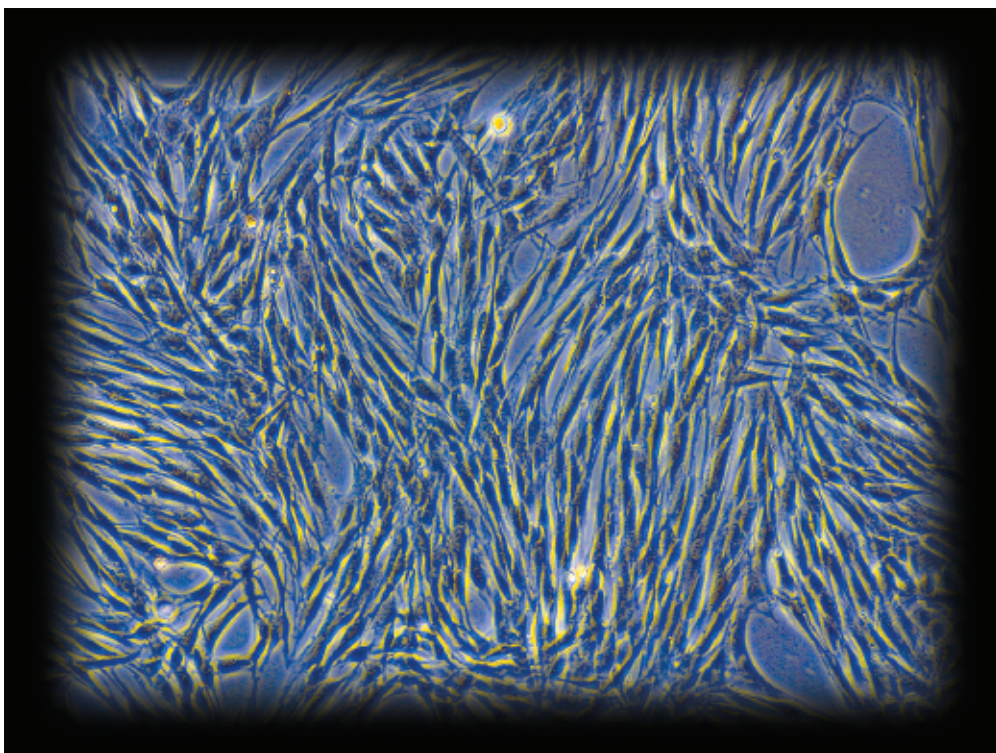
молекуларногенетичких приступа, неопходних за прецизну дијагнозу, избор терапије, прогнозу и успешно праћење тока болести. Осим сарадње у региону, ЛМБм је успоставила и успешну сарадњу са истакнутим центрима и врхунским научницима из земаља Европске уније, из које су проистекле заједничке публикације као и партнерства у значајним пројектима. ЛМБм постаје препозната као регионални експертски центар за ретке болести, што је резултирало и FP7 REGPOT европским пројектом. Овај пројекат је омогућио унапређење биомедицинских наука кроз ојачавање истраживачког потенцијала за изучавање ретких болести у Србији. Прикупљене су биобанке узорака великог броја различитих хуманих патологија које представљају камен темељац за сва будућа истраживања. Захваљујући овом пројекту, ИМГТИ је набавио најмодернију опрему, те је стога омогућена примена најсавременије технологије, као што је секвенцирање нове генерације (*Next Generation Sequencing*, енгл.) у истраживању и дијагностици ретких болести.

Поред научноистраживачких резултата и експертизе у дијагностици ретких болести, ЛМБм активно учествује и у образовању младих кадрова у оквиру Универзитета у Београду, нарочито у процесу израде мултидисциплинарних докторских теза. Данас, тим ЛМБм чини четрнаест доктора наука и пет студената докторских студија, при чему су готово сви доктори наука стасали управо у овој лабораторији, и развили се у успешне истраживаче. Посебно је значајна активност ЛМБм у популаризацији науке, која је започета кроз реализацију пројекта „Мала школа ДНКлогије“, са циљем популаризације молекуларне биологије кроз „уради сам“ експерименте. Поред тога, чланови ЛМБм активно учествују у манифестацијама које популаризују науку, као што су Фестивал науке и Ноћ истраживача.

## Специфичности појединих научноистраживачких области

### Наследне ретке болести

Наследне ретке болести представљају хетерогену групу обољења са недовољно истраженом патогенезом и дијагностичким протоколима. У ЛМБм је изучавана генетичка основа неколико ретких болести у Србији (таласемије, фенилкетонурија, органске ацидурије, гликогенозе), где су методе за детекцију мутација оптимизоване, стварајући основу за молекуларну дијагностику, док су новооткривене генетичке варијанте функционално окарактерисане. Са доласком технологије секвенцирања нове генерације, број ретких болести за које се врши дијагностика у ЛМБм расте из дана у дан.



Мезенхимске матичне ћелије изловане из адипозног ткива пса  
Mesenchymal stem cells isolated from a dog adipose tissue

### Хематолошки малигнитети

Разумевање патофизиологије леукемија, лимфома и мултиплих мијелома значајно је напредовало захваљујући молекуларногенетичким студијама. У ЛМБм је, први пут у Србији, оптимизована методологија којом се генетичке промене, повезане са патогенезом наведених малигнитета, откривају на молекуларном нивоу и користе за постављање дијагнозе, детекцију минималне резидуалне болести и прогнозу. Истраживања ЛМБм су усмерена на праћење поремећаја процеса диференцијације, пролиферације и апоптозе кроз низ метода за детекцију мутација и одређивање нивоа експресије молекуларних маркера, као и на детекцију нових маркера.

### Фармакогеномика

Фармакогеномика проучава однос између генетичких варијанти и одговора на терапију у циљу повећавања ефикасности и смањивања нежељених ефеката лекова. Фармакогенетичка испитивања у ЛМБм су почела проучавањем варијанти у гену *TPMT*, важних за персонализацију терапије тиопуринским лековима. У овој лабораторији је, први пут у Србији, уведена методологија за детекцију клинички релевантних варијанти у гену *TPMT*. На основу ретроспективне и проспективне фармакогенетичке студије на српским пацијентима, показано је да код хетерозиготних носилаца клинички релевантних варијанти у гену *TPMT* треба изменити терапијски протокол смањивањем доза



was used for design and quality assessment of risk prediction model for Crohn's disease and ulcerative colitis. Research also included analyses of expression levels of proinflammatory (*TNF- $\alpha$* , *IL-6*) and apoptotic (*Bcl-2*, *Bax*, *Fas*, *FasL*) genes in inflamed and un-inflamed intestinal mucosa, as well as in peripheral blood of Crohn's disease patients. Also, DNA binding activity of NF $\kappa$ B protein was investigated in intestinal mucosa from patients with Crohn's disease. Results showed that expression levels of analyzed genes, as well as NF $\kappa$ B DNA binding activity, are related with gut mucosa damage specific for Crohn's disease.

### Perthes disease

Perthes disease is idiopathic avascular osteonecrosis of hip in children, with an unknown etiology. Prevailing view is that Perthes disease is multifactorial, caused by combination of environmental and genetic factors. For the first time in Serbia, association of gene variants with a role in coagulation (*FactorV*, *FactorII*, *MTHFR* and *PAI-1*) with Perthes disease appearance was analyzed in LMBm. Furthermore, we analyzed association of genetic markers of inflammation (*IL-6*, *IL-3*, *TNF- $\alpha$* , *TLR4*), and the expression level of *IL-6* and *TNF- $\alpha$*  genes, with Perthes disease. Also, we analyzed the expression level of genes involved in inner: *Bax*, *Bcl-2* and *Bcl2L12*, and extrinsic apoptotic pathway: *Fas* and *FasL* in Perthes patients' samples. The results showed significantly increased level of expression of pro-apoptotic factor *Bax*, along with significantly higher *Bax/Bcl-2* ratio in patient group. This is the first report on main apoptotic factors status in Perthes patients, pointing to relevance of disrupted inner apoptotic pathway in pathophysiology of disease.

### Selected publications

- Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov Drazic M, Petrucevic B, Tosic N, Karan Djurasevic T, Stojanov L, Pavlovic S (2006). Molecular and phenotypic characteristics of patients with phenylketonuria in Serbia and Montenegro. *Clin. Genet.* 70(2):151-5.
- Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucevic 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(6):800-6.
- 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. *Ann. Hematol.* 86(10):741-7.
- 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.
- Giardine B, Borg J, Higgs D, Peterson K, Philipsen S, Maglott D, Singleton B, Anstee D, Basak AN, Clark B, Costa F, Faustino P, Fedosyuk H, Felice A, Francina A, Galanello R, Gallivan M, Georgitsi M, Gibbons R, Giordano P, Hartevelde C, Hoyer J, Jarvis M, Joly P, Kanavakis E, Kollia P, Menzel S, Miller W, Moradkhani K, Old J, Papachatzopoulou A, Papadakis M, 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, Wayne J, Wiemann C, Zukic B, Chui D, Wajcman H, Hardison R, Patrinos P (2011). Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nat. Genet.* 43(4): 295-301.
- Milosevic JD, Puda A, Malcovati L, Berg T, Hofbauer M, Stukalov A, Klampfl T, Harutyunyan AS, Gisslinger H, Gisslinger B, Burjanivova T, Rumi E, Pietra D, Elena C, Vannucchi AM, Doubek M, Dvorakova D, Robesova B, Wieser R, Koller E, Suvajdzic N, Tomin D, Tosic N, Colinge J, Racil Z, Steurer M, Pavlovic S, Cazzola M, Kralovics R (2012). Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 87(11):1010-6.
- Klampfl T, Milosevic JD, Puda A, Schönegger A, Bagienski K, Berg T, Harutyunyan AS, Gisslinger B, Rumi E, Malcovati L, Pietra D, Elena C, Della Porta MG, Pieri L, Guglielmelli P, Bock C, Doubek M, Dvorakova D, Suvajdzic N, Tomin D, Tosic N, Racil Z, Steurer M, Pavlovic S, Vannucchi AM, Cazzola M, Gisslinger H, Kralovics R (2013). Complex Patterns of Chromosome 11 Aberrations in Myeloid Malignancies Target CBL, MLL, DDB1 and LMO2. *PLoS One.* 16;8(10):e77819.
- Paschou P, Drineas P, Yannaki E, Razou A, Kanaki K, Tsetsos F, Padmanabhuni SS, Michalodimitrakis M, Renda MC, Pavlovic S, Anagnostopoulos A, Stamatoyannopoulos JA, Kidd KK, Stamatoyannopoulos G (2014). Maritime route of colonization of Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 111(25):9211-6.
- Zerjav Tansek M, Groselj U, Angelkova N, Anton D, Baric I, Djordjevic M, Grimci L, Ivanova M, Kadam A, Kotori V, Maksic H, Marginean O, Margineanu O, Miljanovic O, Moldovanu F, Muresan M, Nanu M, Samardzic M, Sarnavka V, Savov A, Stojiljkovic M, Suzic B, Tincheva R, Tahirovic H, Toromanovic A, Usurelu N, Battelino T (2015). Phenylketonuria screening and management in southeastern Europe - survey results from 11 countries. *Orphanet J. Rare Dis.* 10:68.
- Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, Grkovic S, Kostic J, Rodriguez-Pombo P, Desviat LR, Pavlovic S, Perez B (2016). Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clin Genet.* doi: 10.1111/cge.12751.

### 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



тиопурина лекова. Осим тога, изучаван је фармакогенички значај некодирајућих варијанти у овом гену, као и утицај тиопурина терапије на ниво експресије гена *TPMT*. Показано је да тиопурина терапија утиче на експресију овог гена која је модулисана варијабилним бројем тандемских поновака у промотору гена *TPMT*. Истраживања су настављена проучавањем варијанти у другим генима релевантним за индивидуализацију терапије тиопурина лековима, као и индивидуализацију терапије лековима метотрексатом и глукокортикоидима, у циљу унапређивања лечења акутне лимфобластне левкемије.

### Запаљењске болести црева

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 ЛМБм је први пут у Србији испитивана асоцијација варијанти у генима *NOD2*, *TLR4*, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  и *IL-1RN* са запаљењским болестима црева. Информације добијене генетичким анализама искоришћене су за дизајн и испитивање квалитета модела за предвиђање ризика за добијање ових болести. Код пацијената са Кроновом болешћу испитивани су и нивои експресије проинфламаторних (*TNF- $\alpha$* , *IL-6*) и апоптотских (*Bcl-2*, *Bax*, *Fas*, *FasL*) гена, како локално, у инфламацијом захваћеном и незахваћеном интестиналном ткиву, тако и системски. Такође, испитивана је ДНК везујућа активност протеина NF $\kappa$ B пореклом из интестиналног ткива пацијената са Кроновом болешћу. Резултати су показали да је ниво експресије испитиваних гена, као и ДНК везујућа активност овог транскрипционог фактора, повезани са променама на интестиналној слузници специфичним за Кронову болест.

### Пертесова болест

Пертесова болест је идиопатска аваскуларна остеонекроза епифизе фемура, чија етиологија је непозната. Болест је мултифакторијална, изазвана комбинацијом срединских и генетичких фактора. У ЛМБм је први пут код пацијената из Србије анализирана асоцијација варијанти гена чији производи учествују у процесу коагулације (*FV*, *FII*, *MTHFR* и *PAI-1*) са појавом Пертесове болести. Поред тога, испитана је асоцијација генских варијанти маркера инфламације (*IL-6*, *IL-3*, *TNF- $\alpha$*  и *TLR4*) и нивоа експресије *IL-6* и *TNF- $\alpha$*  гена, са Пертесовом болешћу. Такође, анализирана је и експресија медијатора унутрашњег: *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl2L12*, и спољашњег: *Fas* и *FasL* апоптотског пута код пацијената са Пертесовом болешћу. Резултати овог истраживања су показали значајно повишен ниво експресије проапоптотског фактора *Bax*, као и повишен однос експресије *Bax/Bcl-2* гена код пацијената. Ово истраживање је прво у коме је анализиран статус маркера апоптозе код пацијената са Пертесовом болешћу и које је указало на значај поремећаја унутрашњег апоптотског пута на развој ове болести.

### Одабране публикације

- Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov Drazic M, Petrucev B, Tosic N, Karan Djurasevic T, Stojanov L, Pavlovic S (2006). Molecular and phenotypic characteristics of patients with phenylketonuria in Serbia and Montenegro. *Clin. Genet.* 70(2):151-5.
- 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(6):800-6.
- 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. *Ann. Hematol.* 86(10):741-7.
- 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.
- Giardine B, Borg J, Higgs D, Peterson K, Philipsen S, Maglott D, Singleton B, Anstee D, Basak AN, Clark B, Costa F, Faustino P, Fedosyuk H, Felice A, Francina A, Galanello R, Gallivan M, Georgitsi M, Gibbons R, Giordano P, Harteveld C, Hoyer J, Jarvis M, Joly P, Kanavakis E, Kollia P, Menzel S, Miller W, Moradkhani K, Old J, Papachatzopoulou A, Papadakis M, 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, Wayne J, Wiemann C, Zukic B, Chui D, Wajcman H, Hardison R, Patrinos P (2011). Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nat. Genet.* 43(4): 295-301.
- Milosevic JD, Puda A, Malcovati L, Berg T, Hofbauer M, Stukalov A, Klampfl T, Harutyunyan AS, Gisslinger H, Gisslinger B, Burjanivova T, Rumi E, Pietra D, Elena C, Vannucchi AM, Doubek M, Dvorakova D, Robesova B, Wieser R, Koller E, Suvajdzic N, Tomin D, Tosic N, Colinge J, Racil Z, Steurer M, Pavlovic S, Cazzola M, Kralovics R (2012). Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 87(11):1010-6.
- Klampfl T, Milosevic JD, Puda A, Schönegger A, Bagienski K, Berg T, Harutyunyan AS, Gisslinger B, Rumi E, Malcovati L, Pietra D, Elena C, Della Porta MG, Pieri L, Guglielmelli P, Bock C, Doubek M, Dvorakova D, Suvajdzic N, Tomin D, Tosic N, Racil Z, Steurer M, Pavlovic S, Vannucchi AM, Cazzola M, Gisslinger H, Kralovics R (2013). Complex Patterns of Chromosome 11 Aberrations in Myeloid Malignancies Target CBL, MLL, DDB1 and LMO2. *PLoS One.* 16;8(10):e77819.
- Paschou P, Drineas P, Yannaki E, Razou A, Kanaki K, Tsetsos F, Padmanabhuni SS, Michalodimitrakis M, Renda MC, Pavlovic S, Anagnostopoulos A, Stamatoyannopoulos JA, Kidd KK, Stamatoyannopoulos G (2014). Maritime route of colonization of Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 111(25):9211-6.
- Zerjav Tansek M, Groselj U, Angelkova N, Anton D, Baric I, Djordjevic M, Grimci L, Ivanova M, Kadam A, Kotori V, Maksic H, Marginean O, Margineanu O, Miljanovic O, Moldovanu F, Muresan M, Nanu M, Samardzic M, Sarnavka V, Savov A, Stojiljkovic M, Suzic B, Tincheva R, Tahirovic H, Toromanovic A, Usurelu N, Battelino T (2015). Phenylketonuria screening and management in southeastern Europe - survey results from 11 countries. *Orphanet J. Rare Dis.* 10:68.
- Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, Grkovic S, Kostic J, Rodriguez-Pombo P, Desviat LR, Pavlovic S, Perez B (2016). Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clin Genet.* doi: 10.1111/cge.12751.



- 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
- 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
- Molecular basis of organic acidurias in Serbia and application of new therapeutic strategies based on genotype (Research project within scientific and technological cooperation between Republic of Serbia and Kingdom of Spain, number 451-03-02635/2011-14/14, 2012–2014)
- Pharmacogenomic markers in immunosuppressant and immunomodulatory drug treatment: from validated biomarkers to genotyping kits and clinical algorithms (Research project within scientific and technological cooperation between Republic of Serbia and Republic of Slovenia, number 451-03-3095/2014-09/45, 2014–2015)
- Strengthening the Research Potential of IMGGE through Reinforcement of Biomedical Science of Rare Diseases in Serbia – en route for innovation - SERBORDISinn (EU-FP7-REGPOT, 316088, 2013–2016)

#### Awards

- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best BSc thesis in the field of molecular biology in Serbia (Ljubica Perišić, 2003; Maja Stojiljković, 2004; Ana Stevanović, 2005; Nikola Kotur, 2009; Kristel Klaassen, 2010; Nikola Novčić 2011)
- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best PhD thesis in the field of molecular biology in Serbia (Branka Zukić, 2010; Milena Radmilović, 2011; Teodora Karan – Đurašević, 2012; Kristel Klaassen, 2015)
- 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)



### 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
- Anemia Syndrome of b/b Rat ( JF-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 (CRP/YUG97-04), ICGEB, Италија, 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” ( 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” ( FP6-LHSHC-CT-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, 2011–2016
- Researchers’Night Fever “RENIFEVER“ (CSA-SA, FP7-PEOPLE-2011-NIGHT- 287432). European Commission, 2011
- Мала школа ДНКлогије (пројекат популаризације науке). Центар за популаризацију науке Републике Србије, 2011
- Молекуларна основа органских ацидурија у Србији и примена нових терапеутских стратегија базираних на генотипу (билатерални пројекат научне и технолошке сарадње између Републике Србије и Краљевине Шпаније, број 451-03-02635/2011-14/14, 2012-2014)
- Фармакогеномички маркери у имunosупресивној и имуномодулаторској терапији: од валидираних маркера до китова за генотипизацију и клиничких алгоритама (билатерални пројекат научне и технолошке сарадње између Републике Србије и Републике Словеније, број 451-03-3095/2014-09/45, 2014-2015)
- Strengthening the Research Potential of IMGGE through Reinforcement of Biomedical Science of Rare Diseases in Serbia – en route for innovation - SERBORDISinn (EU-FP7-REGPOT, 316088, 2013-2016)

### 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; Кристел Клаасен, 2010; Никола Новчић, 2011)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље докторске дисертације из области молекуларне биологије у Србији (Бранка Зукић, 2010; Милена Радмиловић, 2011; Теодора Каран-Ђурашевић, 2012; Кристел Клаасен, 2015)
- 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)





## Лабораторија за молекуларну биологију Laboratory for Molecular Biology



др Снежана Којић  
виши научни сарадник  
Snežana Kojić, PhD  
Senior Research Associate



др Ђорђе Француски  
научни сарадник  
Đorđe Francuski, PhD  
Research Associate



др Александра Несторовић  
научни сарадник  
Aleksandra Nestorović, PhD  
Research Associate



Сандра Драгичевић  
истраживач-приправник  
Sandra Dragičević  
Research Trainee



**Руководилац**  
др Драгица Радојковић  
научни саветник  
**Head**  
Dragica Radojković, PhD  
Principal Research Fellow



др Валентина Ђорђевић  
виши научни сарадник  
Valentina Đorđević, PhD  
Senior Research Associate



др Љиљана Ракићевић  
научни сарадник  
Ljiljana Rakićević, PhD  
Research Associate



Мирјана Новковић  
истраживач-приправник  
Mirjana Novković  
Research Trainee



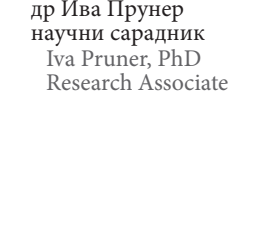
др Марија Станковић  
научни сарадник  
Marija Stanković, PhD  
Research Associate



др Ива Прунер  
научни сарадник  
Iva Pruner, PhD  
Research Associate



Маја Гвозденов  
истраживач-сарадник  
Maja Gvozdenov  
Research Assistant



Срђан Бошковић  
истраживач-приправник  
Srđan Bošković  
Research Trainee



др Јелена Кушић Тишма  
научни сарадник  
Jelena Kušić Tišma, PhD  
Research Associate



др Александра Дивац Ранков  
научни сарадник  
Aleksandra Divac Rankov, PhD  
Research Associate



др Бранко Томић  
научни сарадник  
Branko Tomić, PhD  
Research Associate



Јована Јаснић-Савовић  
истраживач-сарадник  
Jovana Jasnić-Savović  
Research Assistant



Јована Деспотовић  
истраживач-приправник  
Jovana Despotović  
Research Trainee



## Research focus

Laboratory for Molecular Biology (LMB) research is focused on molecular biology and molecular genetics of eukaryotes and in the last decade on biomedicine. LMB mission is to foster fundamental research, and simultaneously develop applied research.

Upon the establishment of LMB, the fundamental research was dedicated to determination of how the local structures of the DNA depends on the nucleotide sequence, as well as the development of molecular diagnostic methods for rare disease cystic fibrosis (CF). The study on correlation of the presence of DNA of human papillomaviruses in cervical lesions and histopathologic findings has contributed to the development of the vaccines against cervical cancer. Within the LMB, a research team was formed to work on the molecular biology of plants, with the focus on the buckwheat storage proteins. In 2002 this group established a new Laboratory.

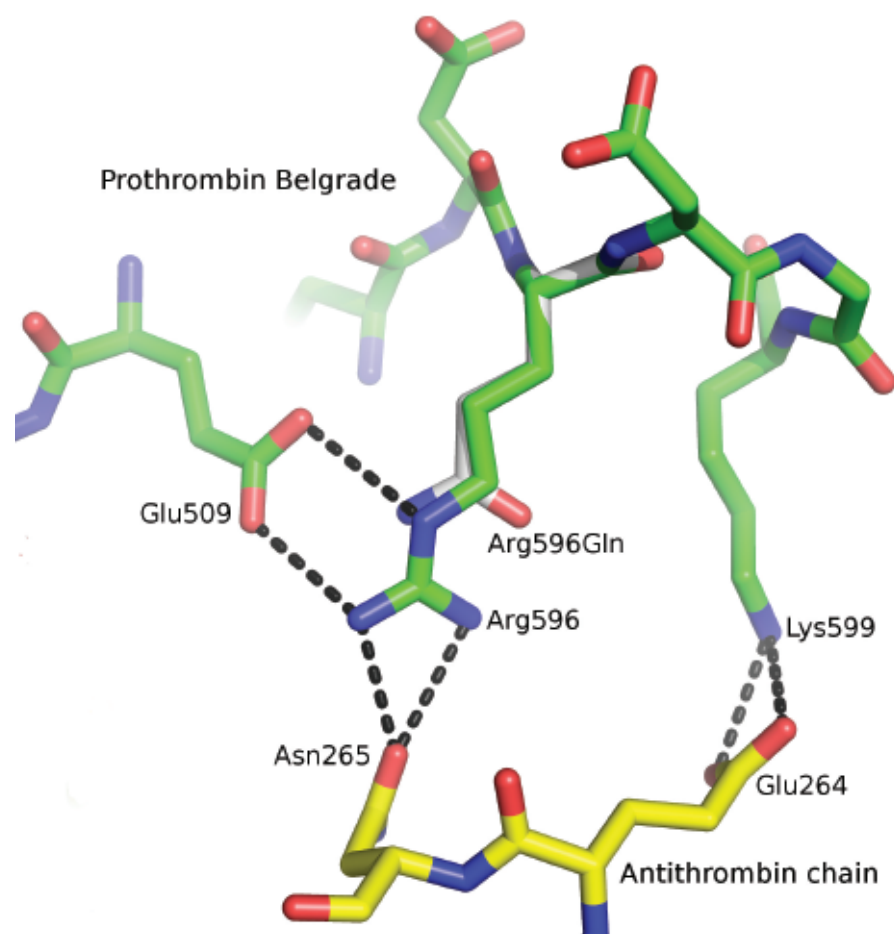
## Cystic fibrosis

The pioneering work of research team within LMB provided the first data on the types and abundance of mutations in the CFTR gene in our population, which created the basis for long-term cooperation in the frame of CF Network and participation in several international projects and data bases. These studies led to the introduction of new diagnostic methods for CF, as well as to their standardization, innovations and modifications regarding the biological material as a source of DNA, as well as the selection of existing methods for the analysis of the target DNA fragments. That included the use of samples from neonatal screening for phenylketonuria, non-viable fluid cells, direct amplification of the DNA from the oral mucosa epithelial cells, and whole blood samples. For the analysis of specific mutations we used nonradioactive asymmetric PCR combined with SSCP (single-strand conformation polymorphism), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by silver staining, and later, automated DNA sequencing based methods. In 1989, for the first time in our country, the prenatal diagnosis was performed in families at risk of CF. 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).

## From molecular diagnostics to fundamental research and back

Pioneering research of LMB in the field of molecular genetics and publications related to the application of molecular diagnostics have played an important role in spreading knowledge regarding the potential of this scientific discipline, as well as in informing physicians about the possibilities and advantages of molecular diagnostics, which until then, in our region, has not been performed. Work in this area has resulted in the design of specific protocols that improved diagnosis, treatment and prevention of various diseases. These protocols have been applied both in the diagnosis and prognosis of rare diseases (cystic fibrosis, hemophilia, alpha-1-antitrypsin deficiency) and multifactorial diseases (cardiovascular, pulmonary, cancer) diseases, as well as in the field of personalized therapy and pharmacogenetics.

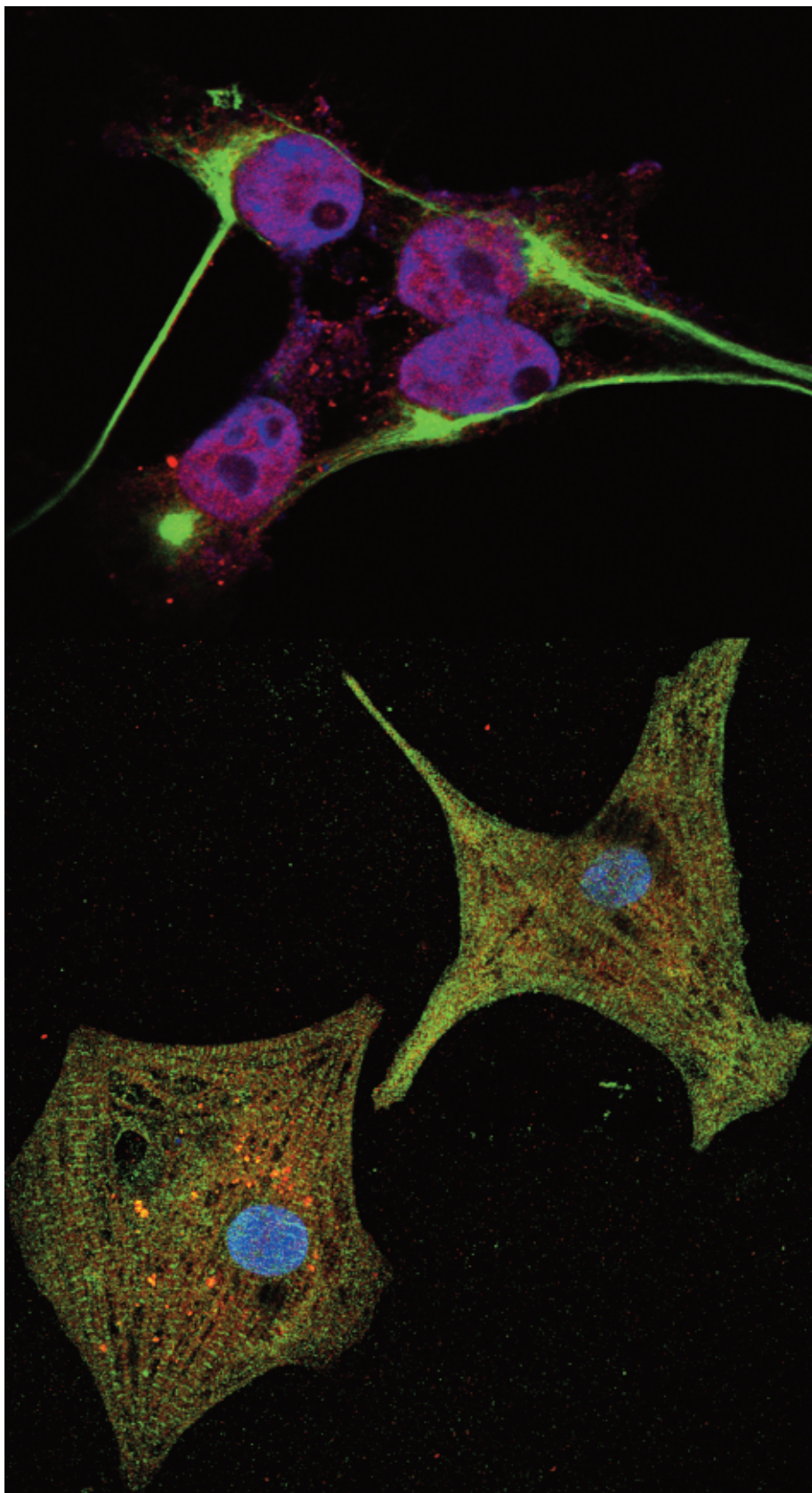
Determination and analysis of mutations in the genes selected for molecular diagnostics (CFTR, FV, FII, FVIII, MTHFR, A1AT, VKORC1, CYP2C9, CYP2C19) enabled filled existing gaps and revealed data for our population on a map of Europe. This applied research has led to accumulation of fundamental results related to the regulation of the expression of the selected genes. The quality and significance of these studies have been confirmed by awarding UNIDO collaborative project, as well as the project of bilateral cooperation with Bulgaria and EURO-GENTEST project within EU framework



Молекуларни модел интеракције између антитромбина и тромбина са Arg596Gln (протромбин Београд) мутацијом  
Antithrombin-thrombin interface with modeled Arg596Gln (prothrombin Belgrade) mutation







Имунодетекција протеина у ћелијама глиобластома. Ankrd1 (црвено), глијални фибриларни кисели протеин GFAP (зелено). Једра су бојена са DAPI (плаво).  
Glioblastoma cells stained for Ankrd1 (red) and glial fibrillary acidic protein GFAP (green) proteins. Nuclei are stained with DAPI (blue)

### Фокус истраживања

Истраживања ЛМБ се одвијају у области молекуларне биологије и молекуларне генетике еукариота, а у последњој деценији су усмерена ка биомедицини. ЛМБ је опредељена да негује фундаментална истраживања уз која се упоредо развијају и примењена истраживања.

Истраживања која је лабораторија спроводила по оснивању била су усмерена на одређивање зависности локалне структуре ДНК од редоследа нуклеотида, као и на освајање метода молекуларне дијагностике на примеру ретког моногенског наследног обољења цистичне фиброзе (ЦФ). Студије у којима је детектовано присуство ДНК хуманих папилома вируса у цервикалним лезијама и утврђена корелација са хистопатолошким налазима, допринеле су развићу вакцине против карцинома грлића материце. У оквиру ЛМБ формирана је и група за рад на молекуларној биологији биљака, која се бавила испитивањем резервних протеина хељде. Ова група се 2002. године издвојила у засебну лабораторију.

### Цистична фиброза

Пионирским радом групе истраживача у ЛМБ су добијени први подаци о типовима и заступљености мутација у CFTR гену у нашој популацији који су укључени у европске студије чиме је постављена основа за дугогодишњу сарадњу у оквиру CF Network и учешће у неколико међународних пројеката и база података. Ова истраживања довела су до увођења нових дијагностичких метода за цистичну фиброзу, као и њихове стандардизације, иновације и модификације које су се односиле како на извор биолошког материјала који се може користити за детектовање мутација, тако и на примену постојећих метода за анализу циљних фрагмената ДНК. Тако су за добијање материјала за анализу коришћени узорци из неонаталног скрининга на фенилкетонурију, невијабилне ћелије супернатанта културе ћелија амнионске течности, директно умножавање ДНК из епителијалних ћелија оралне мукозе и узорака пуне крви. За анализу одређених мутација коришћен је асиметричан нерадиоактиван PCR у комбинацији са SSCP (*single-strand conformation polymorphism*, енгл.), електрофореза на геловима са градијентом денатуришућег агенса и њихово бојење сребром, а касније и методе аутоматског секвенцирања ДНК. Први пут код нас су рађене пренаталне дијагнозе у породицама са ризиком од цистичне фиброзе, а у тим породицама су испитиване и мутације у CFTR гену, као и њихова корелација



programs FP6 and FP7. In cooperation with Erasmus University in the Netherlands we formed the first national genetic database of mutations in hereditary diseases in Serbia ([www.goldenhelix.org](http://www.goldenhelix.org)). Historically, this approach has defined the current concept of LMB.

### The correlation between genotype and phenotype

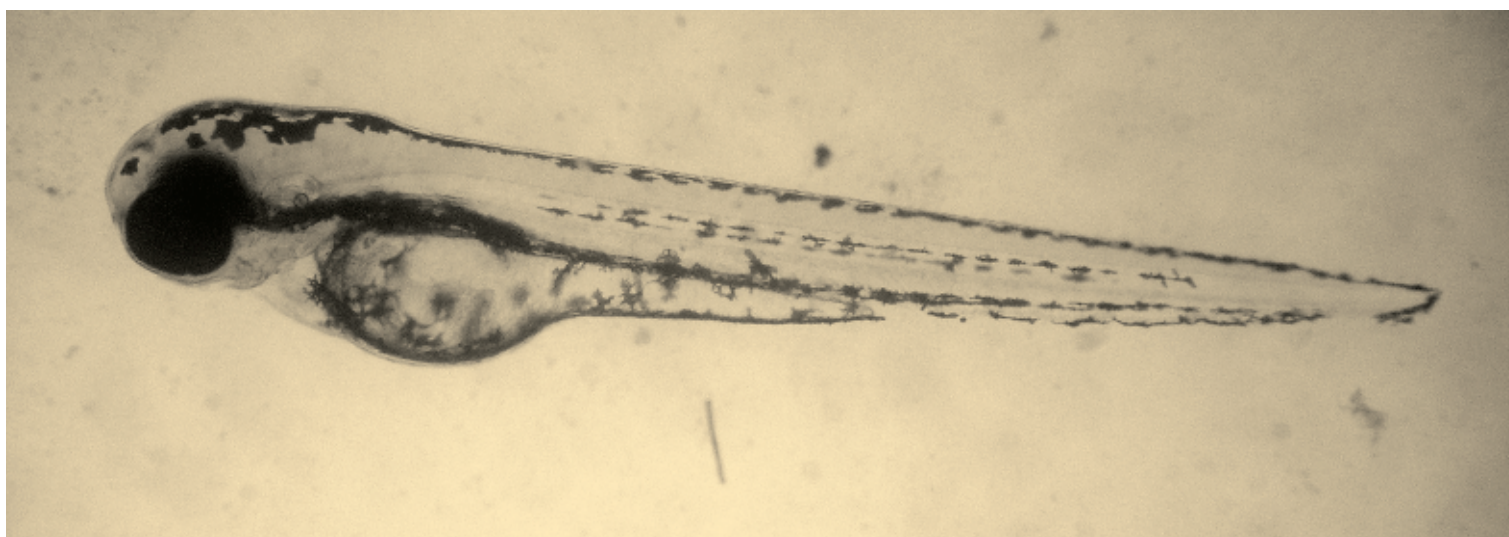
The main tracks of LMB research are genotype-phenotype correlation studies. The repertoire of the investigated genes related to human diseases is constantly expanding, with the aim to reveal their modulatory role in respiratory (COPD, CF, asthma), cardiovascular (thrombosis, cardiomyopathy), malignant (adenocarcinoma of the pancreas, colorectal cancer, lung cancer, thyroid cancer) and gastrointestinal (chronic pancreatitis) diseases and their impact on the therapeutic efficacy of the different pharmacological substances (pharmacogenetics).

Common characteristic of selected genes is their involvement in regulation of hemostasis, inflammatory processes, tissue remodeling, protection from oxidative stress, cell proliferation and cell death.

Genes, which we choose through associative studies as potential modulators of phenotype, have been further analyzed on posttranscriptional and/or posttranslational levels. For these studies, we used *in vitro* model systems, permanent and primary cell lines, as well as zebra fish (*Danio rerio*) as an animal model. Our ultimate goal is to establish a combined modulatory effect of different genes and to elucidate DNA-protein and protein-protein interactions that affect the phenotype.

### Structure and DNA replication

Important studies for LMB, from historical point of view, were those aimed at deciphering how local structure of DNA depends on the nucleotide sequences, using DNase I as a probe. These studies, showed that the curvature of the DNA can occur in fragments rich in GC, not only in the AA/TT rich fragments, as previously suggested. Using synthetic polynucleotides it has been shown that GGGCCC DNA sequences bend in the opposite direction of curvature occurring in AAAAA regions. Having in mind that local DNA structure could affect protein-DNA recognition, research has been expanded to the interaction of DNA and proteins in the context of one of the most important cellular processes - DNA replication. Early embryos of *Drosophila melanogaster* were used as a model system, since they are characterized with intensive DNA synthesis and rich in proteins involved in DNA replication. By designing specific DNA probes and using other experimental approaches, several binding proteins and enzymes were selected and identified as participants in the process of DNA replication such as Helicase III, 3'-exonucleases and nuclease Den1, Den2 and Den3. Afterwards, the components involved in human DNA replication (lamin B2 origin of replication and Orc4, subunit 4 of human ORC) were used. Noncanonical DNA elements were found within functionally essential *ori* sequences. It was shown that initiation protein Orc4 could mediate formation of triple stranded DNA structures. Moreover it has binding preferences toward DNA triplex. Combined results suggested potential role of unorthodox DNA structures in origin recognition by initiation complex. These studies were carried out in the framework of two collaborative projects with the ICGEB.



Зебра-рибица се користи као модел систем за изучавање болести човека  
Zebrafish as a model system for human pathology studies

са фенотипом. Поред анализе CFTR гена пацијената са ЦФ, ове анализе рађене су и код пацијената са атипичним симптомима ЦФ, као и код обољења у чију је етиологију укључен CFTR ген, тзв. CFTR-патија (инфертилитет код мушкараца, хронични панкреатитис, дисеминиране бронхиектазије).

### Од молекуларне дијагностике до фундаменталних истраживања и назад

Пионирска истраживања ЛМБ у области молекуларне генетике и радови везани за примену молекуларне дијагностике имали су значајну улогу у ширењу знања о потенцијалима ове научне дисциплине као и у информисању лекара о могућностима и предностима молекуларне дијагностике која дотада, на нашим просторима, још увек није имала примену. Рад на овом пољу резултирао је дизајнирањем конкретних протокола који су омогућили унапређење дијагностике, лечења и превенције различитих болести. Истраживања су примењена како у дијагностици и прогностици моногенских болести (цистична фиброза, хемофилија, дефицијенција алфа-1-антитрипсина) и мултифакторијалних болести (кардиоваскуларне, плућне, малигне), тако и на пољу персонализоване терапије и фармакогенетике.

Одређивање и анализа мутација у генима одабраним за молекуларну дијагностику (CFTR, FV, FII, FVIII, MTHFR, A1AT, VKORC1, CYP2C9, CYP2C19) омогућила је попуњавање празнина које су, у том погледу, постојале за нашу популацију на карти Европе. Ова примењена истраживања су довела до нових фундаменталних резултата везаних за регулацију експресије поменутих гена. Квалитет радова проистеклих из ове проблематике и њихов значај за развој науке у нашој земљи потврђени су и колаборационим пројектом UNIDO, као и кроз пројекат билатералне сарадње са Бугарском и EUROGENTEST пројекат у оквиру FP6 и FP7 међународног програма. У сарадњи са Универзитетом Ерасмус у Холандији оформљена је прва национална мутациона база података наследних болести у Србији ([www.goldenhelix.org](http://www.goldenhelix.org)). Историјски, овај приступ је дефинисао данашњи концепт рада ЛМБ.

### Корелација генотипа и фенотипа

Главни правац истраживања ЛМБ већ дужи низ година је испитивање корелације генотипа са фенотипом. Репертоар изучаваних гена је константно прошириван, у циљу испитивања зависности фенотипа од промена на нивоу ДНК и откривања комбиноване модулаторне улоге гена који учествују у респираторним (хронична опструктивна болест плућа, ЦФ, астма), кардиоваскуларним (тромбоза, кардиомиопатије), малигним (аденокарцином панкреаса, колоректални канцер, карцином плућа, карцином штитне жлезде) и гастроентеролошким (хронични панкреатитис) болестима и/или имају утицаја на терапијску ефикасност појединих фармаколошких супстанци (фармакогенетика).

Заједничко за већину одабраних група гена јесте учешће у регулацији хемостазе, инфламаторним процесима, заштити од оксидативног стреса, ремоделовању ткива, сигналним путевима, ћелијској пролиферацији и ћелијској смрти.

Гени, тј. алели, за које је утврђено, на основу асоцијативних студија, да су потенцијални модулатори фенотипа, даље се анализирају на посттранскрипционом и/или посттранслационом нивоу, зависно од нивоа на којем је уочен ефекат промене на ДНК. За поменуте анализе, користе се *in vitro* модел системи, системи перманентних и примарних ћелијских линија, као и модел зебра рибице (*Danio rerio*). Крајњи циљ јесте утврђивање комбинованог модулаторског ефекта различитих гена као и одређивање ДНК—протеин и протеин—протеин интеракција које утичу на фенотип.

### Структура и репликација ДНК

Историјски су значајна изучавања локалне структуре ДНК у зависности од секвенце нуклеотида коришћењем DNase I као сонде. Истраживања су показала да до закривљења ДНК може доћи и у регионима богатим GC паровима, а не само у регионима 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 AAAAAA фрагментима. 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. Као извор протеина који учествују у репликацији ДНК коришћени су рани ембриони винске мушице (*Drosophila melanogaster*), у којима се одвија интензивна синтеза ДНК. Дизајнирањем специфичних ДНК проба, као и другим експерименталним приступима, селектовани су протеини који се везују за та места, и идентификовано је неколико 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, чију активност инхибира АТФ. 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 оги репликације могуће интрамолекулске троланчане структуре ДНК, што такође може да служи као знак 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 су реализована у оквиру заједничког пројекта са ICGEB-ом.



### Molecular biology of muscle cells

In collaboration with Muscle Molecular Biology Unit of ICGEB, a new field of study was initiated in the LMB. The main goal of this research is to functionally characterize regulatory proteins Ankrd1 and Ankrd2 in cardiac and skeletal muscles and to decipher their roles in the molecular mechanisms of the striated muscles diseases. These proteins connect the elastic I band of the sarcomere with the regulation of transcription in the nucleus. Studies are focused on the detection of signaling pathways in which Ankrd1 and Ankrd2 participate, in identifying their downstream targets, as well as the molecular mechanisms of regulation of their expression. We are also involved in the detection of mutations in the *ANKRD1* gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy, as well as in determination of the status of Ankrd1 and Ankrd2 in inherited myopathies. In order to decipher the roles and Ankrd1 and Ankrd2 in development and regeneration of the heart we use zebrafish (*Danio rerio*) as a model system. In contrast to the human heart, not able to regenerate after injury such as acute myocardial infarction, zebra fish heart has the remarkable potential of regeneration. After local cryoinjury, complete regeneration is achieved only after 2 months. This and other characteristics such as high fecundity and transparency of embryos make zebrafish an indispensable model system. Using the modern methodological approach for gene editing by CRISPR/Cas9 technology we knocked out the expression of *Ankrd1* and *Ankrd2*, and we are monitoring how the lack of these proteins affects development and regeneration of the heart.

During 30 years of active research, LMB has developed into a team that successfully fosters basic research, but at the same time, uses its capacity for applied research in biomedicine. LMB scientists actively transfer their knowledge to young colleagues and create dynamic academic atmosphere for scientific research and progress.

### Selected publications

- Brukner-Dabović B, Radojković D, Savić J, Sretenović Z, Savić A. (1989) DNA probes in diagnostics of cystic fibrosis. *Yugoslav Pediat.* 32, 16-20.
- Brukner I, Jurukovski V, Savić A. (1990) Sequence-dependent structural variations of DNA revealed by DNase I. *Nucl.Acids Res.* 18, 891-894
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kojic S, Radojkovic D, Faulkner G. (2011) Muscle ankyrin repeat proteins: their role in striated muscle function in health and disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 48 (5-6), 269-294
- Djordjevic V, Kovac M, Miljic P, Murata M, Takagi A, Pruner I, Francuski D, Kojima T, Radojkovic D. (2013) A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia – the first cases of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost.* 11(10), 1936-1939
- Nikolic A, Milosevic K, Boskovic S, Nestorovic B. (2014) Neutrophil elastase gene polymorphisms: modulators of response to therapy in childhood bronchiectasis? *Lung*, 192(4), 595-599
- Nikolic A, Cacev T, Aralica G, Hadzija MP, Kapitanovic S, Radojkovic D. (2015) Mononucleotide repeats in the SMAD4 gene promoter in colon carcinoma tissue of Croatian patients. *Exp Mol Pathol*, 98(2), 133-135

### Projects

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



### Молекуларна биологија мишићне ћелије

У сарадњи са Одељењем за молекуларну биологију мишића ICGEB-а отворено је ново поље истраживања у ЛМБ. У циљу дефинисања молекуларних механизма неуромишићних обољења и кардиомиопатија изучавамо структурну и регулаторну улогу сензора стреса, протеина Ankrd1 и Ankrd2 у мишићној ћелији. Они повезују еластичну И-траку саркомере са механизмима регулације транскрипције у једру. Истраживања су усмерена на откривање сигналних путева у којима Ankrd1 и Ankrd2 учествују; на идентификацију њихових низводних таргета; као и на одгонетање молекуларних механизма регулације њихове експресије. Такође смо укључени у детекцију мутација у гену *Ankrd1* код пацијената оболелих од хипертрофичне кардиомиопатије, а изучавамо и статус протеина Ankrd2 у неуромишићним обољењима. Модел систем зebra рибице (*Danio rerio*) користимо за осветљавање улоге Ankrd1 и Ankrd2 у развићу и процесу регенерације срца. За разлику од срца човека које не подлеже регенерацији након повреде као што је акутни инфаркт миокарда, срце зebra рибице поседује изванредну моћ регенерације. Након локалног повређивања смрзавањем, до потпуне регенерације срца долази након само 2 месеца. Ова и друге карактеристике као што су висок фекундитет и транспарентност ембриона чине зebra рибицу незаменљивим модел системом. Најсавременијим методолошким приступом за манипулацију генима (*gene editing*, енгл) и уношењем прецизних промена у молекуле ДНК (CRISPR/Cas9 технологија) угасили смо експресију *Ankrd1* и *Ankrd2*, и пратитимо ефекат недостатка ових протеина на развиће и процес регенерације срца.

Током 30 година активног рада ЛМБ се развила у тим који успешно негује фундаментална истраживања, а уједно, своје капацитете користи и за примењена истраживања у биомедицини. Сарадници ЛМБ активно преносе стечена знања на млађе колеге и креирају академску атмосферу за научни рад и континуиран напредак.

### Одабране публикације

- Brukner-Dabović B, Radojković D, Savić J, Sretenović Z, Savić A. (1989) DNA probes in diagnostics of cystic fibrosis. *Yugoslav Pediat.* 32, 16-20.
- Brukner I, Jurukovski V, Savić A. (1990) Sequence-dependent structural variations of DNA revealed by DNase I. *Nucl.Acids Res.* 18, 891-894
- Krajnović 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kojic S, Radojkovic D, Faulkner G. (2011) Muscle ankyrin repeat proteins: their role in striated muscle function in health and disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 48 (5-6), 269-294
- Djordjevic V, Kovac M, Miljic P, Murata M, Takagi A, Pruner I, Francuski D, Kojima T, Radojkovic D. (2013) A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia – the first cases of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost.* 11(10), 1936-1939
- Nikolic A, Milosevic K, Boskovic S, Nestorovic B. (2014) Neutrophil elastase gene polymorphisms: modulators of response to therapy in childhood bronchiectasis? *Lung*, 192(4), 595-599
- Nikolic A, Cacev T, Aralica G, Hadzija MP, Kapitanovic S, Radojkovic D. (2015) Mononucleotide repeats in the SMAD4 gene promoter in colon carcinoma tissue of Croatian patients. *Exp Mol Pathol*, 98(2), 133-135

### Пројекти

- 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
- Рекомбинантна 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 (CRP/YUG96-05), ICGEB, Италија, 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 (CRP/YUG03-01), ICGEB, Италија, 2004–2006
- EUROGENTEST (међународни пројекат, FP6 – 512148). Европска унија, 2005–2009
- Структурни елементи генома у модулацији фенотипа (основна истраживања, бр. 143051B). Министарство за науку и технологију Републике Србије, 2006–2010



- 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 (2011–2016)
- EUGT2, EU project, FP7-261469 (2011–2013) MMP9 gene polymorphisms as modulators of treatment response in asthma. Research project within scientific and technological cooperation between Republic of Serbia and Republic of Slovenia, 2014–2015
- Functional characterization of striated muscle signaling protein Ankrd2 in aves, Project of the Serbian–Chinese bilateral scientific collaboration, 2015–2017
- Zebrafish (*Danio rerio*) as a model system for studying the role of muscle ankyrin repeat proteins Ankrd1 and Ankrd2 in cardiogenesis and heart regeneration, Project of the Serbian–German bilateral scientific collaboration, 2015–2016.
- Developmental Origins of Chronic Lung Disease, BM1201,
- Cooperation Studies on Inherited Susceptibility to Colorectal Cancer, BM1206
- Networking towards clinical application of antisense-mediated exon skipping, BM1207

#### Awards

- Dragana Stefanović, awarded researcher in the field of biology for results in year 2002 by MSTD
- Valentina Djordjević, awarded researcher in the field of biology for results in year 2002 by MSTD
- Aleksandra Nikolić, Aleksandra Divac, Mila Ljujić – third place in the field of biology in the competition for the best technological innovation in Serbia in the category of "potentials"– 2008
- Dragica Radojkovic – 2008 awarded for the work ranked among the top ten of the citations in the journal " Journal of Cystic Fibrosis – Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice (2008;7(3):179-196)
- Award of the "Goran Ljubijankić" Foundation for the best BSc thesis in the field of molecular biology in Serbia (Sandra Vranic, 2008)
- Award of the "Goran Ljubijankić" Foundation for the best PhD thesis in the field of molecular biology in Serbia (Aleksandra Divac, 2008; Branko Tomic, 2012; Iva Pruner, 2014)



- The role of human skeletal muscle protein ANKRD2/ARPP in striated muscle (међународни пројекат CRP/YUG05-01), ICGEB, Италија, 2006–2008
- Structural alterations of DNA induced by initiator protein (CRP/YUG08-01), ICGEB, Италија, 2009–2011
- Комплексне болести као модел систем за проучавање модулације фенотипа–структурална и функционална анализа молекуларних биомаркера (основна истраживања, бр.173008). Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2011–2016
- EUGT2 (FP7-261469). Европска унија, 2011–2013
- Полиморфизми у гену за ММП9 као модулатори одговора на терапију у астми. Научно–истраживачки пројекат у оквиру научно–технолошке сарадње између Републике Србије и Републике Словеније, 2014–2015
- Функционална карактеризација мишићног сигналног протеина Ankrd2 код птица, Међународни пројекат научно–технолошке сарадње Републике Србије и Народне Републике Кине, 2015–2017
- Зебра–рибица (*Danio rerio*) као модел систем за изучавање улоге мишићних протеина са анкиринским поновцима Ankrd1 и Ankrd2 у развићу и регенерацији срца, Међународни пројекат научно–технолошке сарадње Републике Србије и Савезне Републике Немачке, 2015–2016
- Developmental Origins of Chronic Lung Disease, BM1201
- Cooperation Studies on Inherited Susceptibility to Colorectal Cancer, BM1206
- Networking towards clinical application of antisense–mediated exon skipping BM1207

### Награде

- Драгана Стефановић – награђени истраживач из области биологије према резултатима у 2002. години (награда додељена 2004)
- Валентина Ђорђевић – награђени истраживач из области биологије према резултатима у 2002. години (награда додељена 2004)
- Александра Николић, Александра Дивац, Мила Љујић – 2008. године освојено треће место у области биологија на Такмичењу за најбољу технолошку иновацију у Србији, у категорији „Потенцијали”
- Драгица Радојковић – 2008. године награђена за рад рангиран међу првих десет по цитираности у часопису Journal of Cystic Fibrosis – Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice (2008;7(3):179-196)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље дипломске радове из области молекуларне биологије у Србији (Сандра Вранић, 2007)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље докторске дисертације из области молекуларне биологије у Србији (Александра Дивац, 2008; Бранко Томић, 2012; Ива Прунер, 2014)





Основни истраживачки интерес Лабораторије за хуману молекуларну генетику (ЛХМГ) усмерен је на проучавање хуманих SOX gena који кодирају транскрипционе факторе укључене у важне процесе током развића сисара. Након клонирања, одређивања структуре, хромозомске локације и експресије, проучавани су механизми транскрипционе регулације експресије хуманих SOX2, SOX3, SOX14 и SOX18 gena.

Истраживачки интерес ЛХМГ је и проучавање улоге ових gena у процесима *in vitro* неуралне диференцијације и онкогенезе. Одређен је епигенетички статус појединих SOX gena током ових процеса и описана улога Wnt и SHH сигналних путева у регулацији експресије SOX gena.

Однедавно, део истраживања је усмерен на анализу диверзитета митохондријске ДНК у савременој популацији Србије са популационо-генетичког, филогенетског и филогеографског аспекта и освртом на генетичке, демографске и друге процесе који су довели до генезе савременог митохондријског генског пула.

Main research interest of the Laboratory for Human Molecular Genetics (LHMG) is focused on human SOX genes, large family of transcription factors implicated in the regulation of various developmental processes in mammals. After the cloning and determination of the structure, chromosomal location and expression we have analyzed transcriptional regulation of SOX2, SOX3, SOX14 and SOX18 genes expression.

Furthermore, we have studied the roles of these genes in the processes of *in vitro* neural differentiation and oncogenesis. We have also examined epigenetic status of several SOX genes and analyzed interactions between SOX genes and Wnt and SHH signaling pathways in these processes.

Recently, the analysis of the mitochondrial DNA diversity in contemporary human population of Serbia has been initiated in our Laboratory. Using population genetics, phylogenetic and phylogeographic approaches, we provided new insights into genetic, demographic and other processes that shaped mitochondrial gene pool of our population.





## Лабораторија за хуману молекуларну генетику Laboratory for Human Molecular Genetics



**Руководилац**  
академик др Милена Стевановић  
научни саветник  
**Head**  
Academician Milena Stevanović, PhD  
Principal Research Fellow



др Марија Мојсин  
научни сарадник  
Marija Mojsin, PhD  
Research Associate



др Наташа Ковачевић Грујичић  
научни сарадник  
Natasa Kovačević Grujičić, PhD  
Research Associate



др Андријана Клајн  
научни сарадник  
Andrijana Klajn, PhD  
Research Associate



др Јелена Поповић  
научни сарадник  
Jelena Popović, PhD  
Research Associate



др Исидора Петровић  
научни сарадник  
Isidora Petrović, PhD  
Research Associate



др Марија Швиртлих  
научни сарадник  
Marija Švrtlih, PhD  
Research Associate



Слободан Давидовић  
истраживач-сарадник  
Slobodan Davidović  
Research Assistant



Слободан Давидовић  
истраживач-сарадник  
Slobodan Davidović  
Research Assistant



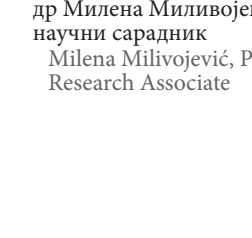
Данијела Станисављевић  
истраживач-сарадник  
Danijela Stanisavljević  
Research Assistant



др Данијела Дракулић  
научни сарадник  
Danijela Drakulić, PhD  
Research Associate



Владанка Топаловић  
истраживач-сарадник  
Vladanka Topalović  
Research Assistant



др Милена Миливојевић  
научни сарадник  
Milena Milivojević, PhD  
Research Associate



Јелена Марјановић Вићентић  
истраживач-сарадник  
Jelena Marjanović Vičentić  
Research Assistant



## Research focus

### SOX genes

Since established, the research interest of the LHMG has been focused on studying the human *SOX* genes encoding regulatory proteins with critical roles in numerous developmental processes, including stemness, proliferation, cell fate determination and differentiation. *SOX* genes are divided into ten groups. Our research is directed on *SOXB* group family members (*SOX1*, *SOX2*, *SOX3*, *SOX14*) that play major roles in pluripotency maintenance and neural system development, as well as on *SOX18* gene, implicated in the regulation of blood and lymphatic vascular system development and adult angiogenesis.

### Cloning and studying the structure of the human *SOX* genes

During the work in Department of genetics, University of Cambridge, Dr. Milena Stevanović was involved in the discovery of the human *SOX* gene family. The study of *SOX* genes was continued in Belgrade in LHMG. During collaboration, screening of numerous genomic and cDNA libraries resulted in the cloning of six novel members of the human *SOX* gene family (*SOX2*, *SOX3*, *SOX9*, *SOX14*, *SOX18* and *SOX20*). Further research was focused on studying the structure, chromosomal location and expression of the newly identified members of this gene family.

### Studying the transcriptional regulation of *SOX* genes expression

After initial characterization, the research team of LHMG has been involved in studying the regulation of the human *SOX* genes expression. The research was focused on the characterization of regulatory regions of the human *SOX3*, *SOX14* and *SOX18* genes. The work included determination of transcription start points, mapping of the promoter regions, functional analysis of control elements and detection of tissue-specific transcription factors involved in the regulation of selected *SOX* genes. In addition, two novel, atypical retinoic acid (RA)-response elements were identified within the *SOX3* promoter region, while retinoid receptor RXR $\alpha$  was identified as a major mediator of RA-induced *SOX3* gene upregulation.

### *SOX* genes in neural differentiation

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 and adult neurogenesis *SOX1*, *SOX2* and *SOX3* transcription factors control many different processes, including progenitor maintenance, cell fate decision and terminal differentiation. Accordingly, our research was focused on roles of *SOX2* and *SOX3* genes in neural differentiation using human pluripotent embryonal carcinoma NT2/D1 cells, as they have the ability to differentiate *in vitro* along the neural lineage in the presence of RA.

The role of *SOX2* gene in neural differentiation was investigated through the generation of NT2/D1 cell clones with constitutive overexpression of *SOX2* and analyzing the effects on outcome of retinoic acid-induced neural differentiation of pluripotent NT2/D1 cells. We have shown that under these conditions number of mature neurons was decreased, while the number of glial cells was not affected. Also, we demonstrated that *SOX2* expression was completely abolished in mature neurons, while some mature astrocytes maintained low levels of this protein. In addition, our results implicate that fine balance between undifferentiated state and the induction of neural differentiation depends on the *SOX2* expression level.

Furthermore, we have shown that *SOX14*, another member of *SOXB* genes, plays important roles in the process of neural differentiation. This gene is expressed in human NT2/D1 and murine P19 pluripotent embryonal carcinoma cell lines, and is upregulated in both cell lines during neural differentiation induced by RA.

In our further studies of the regulation of *SOX3* gene expression, we have analyzed epigenetic status of this gene during neural differentiation of NT2/D1 cells. We have shown that dynamic changes in the histone modifications profiles play role in the activation of *SOX3* gene during early phases of neural differentiation. In addition, we have analyzed histone marks spanning across promoters of pluripotency factors (*SOX2*, *Oct4* and *Nanog*) in the same timeframe. This analysis revealed that, during early phases of neural differentiation, profiles of histone modifications on these promoters are opposite to those observed on the promoter of *SOX3* gene.

Our research enable identification of signaling networks that are involved in the regulation of *SOX2*, *SOX3* and *SOX14* genes expression and contribute to the better understanding of the roles of these genes in maintenance of neural progenitors, cell fate determination and neural differentiation.

### *SOX* genes in oncogenesis

One of the novel research interests in LHMG is focused on investigation of the roles of *SOX* genes in oncogenesis in various *in vitro* model systems of human carcinoma.

Having in mind the complementary roles of Wnt signaling pathway and *SOX* genes during tumor development and progression, we in-



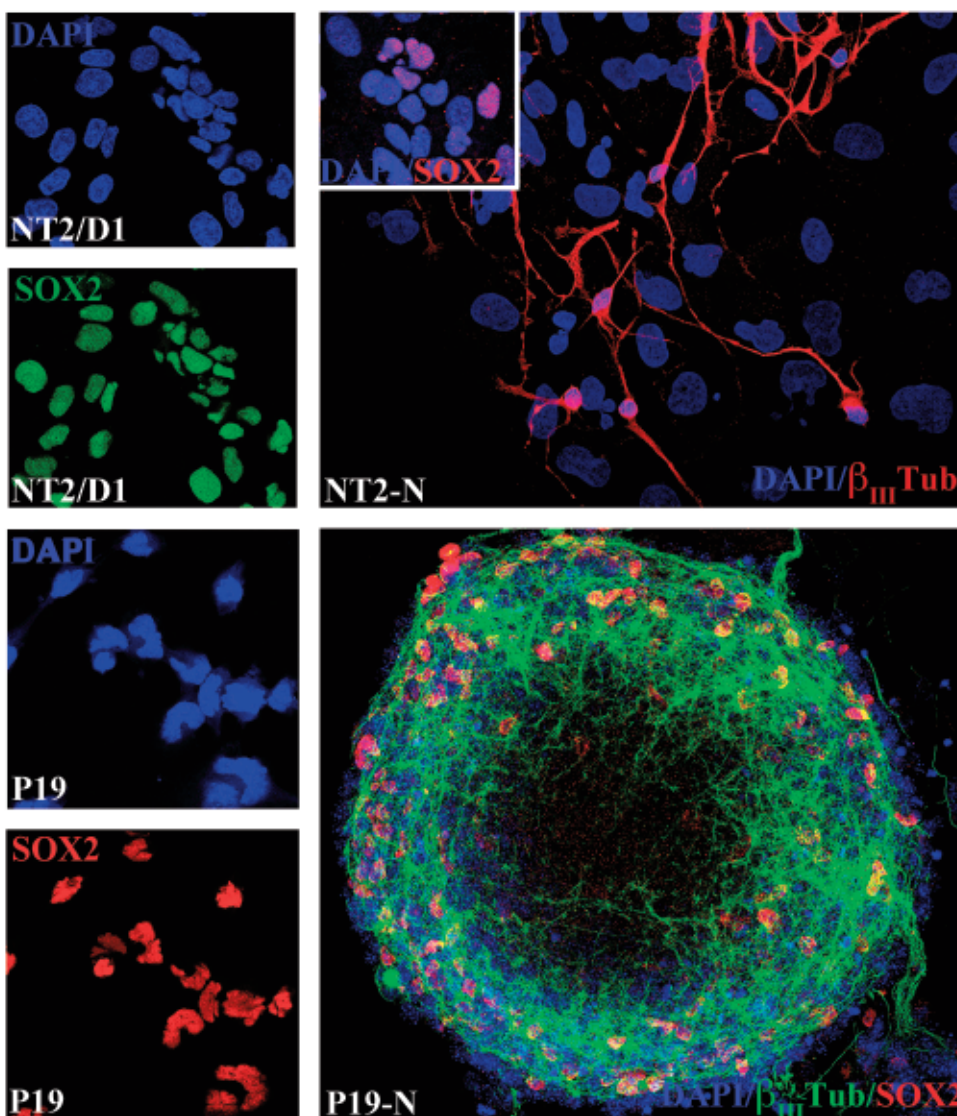
## Фокус истраживања

### SOX гени

Од самог оснивања, истраживачки интерес Лабораторије за хуману молекуларну генетику био је усмерен на проучавање хуманих SOX гена. SOX гени кодирају регулаторне протеине који током развића сисара имају важне улоге у одржавању плурипотентности, пролиферацији, диференцијацији и одређивању судбине ћелија. SOX гени су подељени у десет група, а истраживања су обухватала рад на генима SOXB групе (SOX1, SOX2, SOX3, SOX14), који учествују у одржавању плурипотентности матичних ћелија и развићу нервног система, као и SOX18 гену који има улогу у регулацији раних фаза развића крвног и лимфног система као и у адултној ангиогенези.

### Клонирање и проучавање структуре хуманих SOX гена

Током боравка на Универзитету у Кембриџу, на Катедри за генетику, др Милена Стевановић је била у истраживачком тиму који је учествовао у открићу фамилије хуманих SOX гена. Истраживања на овим генима настављена су и након оснивања ЛХМГ. Као резултат сарадње, претраживањем геномских и cDNA библиотека, клонирано је шест нових чланова ове мултигенске фамилије - гени SOX2, SOX3, SOX9, SOX14, SOX18 и SOX20. Даља истраживања била су усмерена на одређивање структуре, хромозомске локације и експресије новооткривених чланова фамилије хуманих SOX гена.



Динамичка експресија SOX2 транскрипционог фактора током *in vitro* неуралне диференцијације хуманих и мишијих ембрионалних карциномских матичних ћелија  
Dinamic expression of SOX2 transcription factor during *in vitro* neural differentiation of human and mouse embryonal carcinoma (EC) stem cells

### Проучавање транскрипционе регулације експресије SOX гена

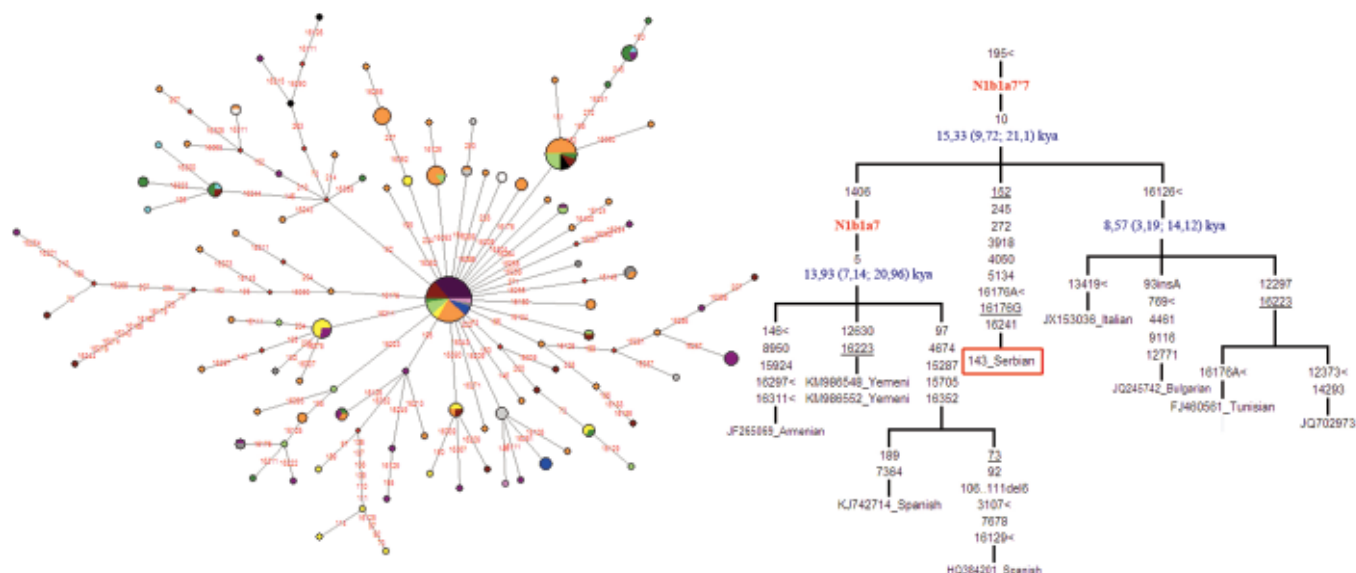
Након иницијалне карактеризације, истраживачки тим ЛХМГ бавио се проучавањем механизма регулације експресије хуманих SOX гена. На почетку, рад је био усмерен на карактеризацију регулаторних региона хуманих SOX3, SOX14 и SOX18 гена и обухватао је утврђивање старта транскрипције, дефинисање промотора, функционалну анализу контролних елемената, као и анализу протеина који се специфично везују за ове елементе. Истраживања су довела до идентификације бројних општих и ткивно-специфичних регулаторних протеина укључених у транскрипциону регулацију експресије ових SOX гена. Поред тога, показано је да је активација SOX3 гена ретиноичном киселином посредована нуклеарним ретиноидним рецептором RXRa и идентификована су два атипична контролна елемента преко којих се ова активација остварује.

### SOX гени у неуралној диференцијацији

Однедавно, значајна пажња у ЛХМГ посвећена је идентификацији молекуларних механизма одговорних за одржавање неуралних прогенитора и судбине матичних ћелија током онтогенезе. Истраживања су показала да током развића нервног система регулаторни протеини SOX1, SOX2 и SOX3 контролишу многобројне процесе, укључујући одржавање плурипотентности, одређивање судбине ћелија и терминалну диференцијацију. Експресија ових протеина детектована је и у адултном мозгу, где одржавају популацију неуралних прогенитора и контролишу адултну неурогенезу.

Због тога је један од циљева истраживања био проучавање улоге SOX2 и SOX3 гена у процесима неуралне диференцијације. Њихова улога испити-





Молекуларно генетичка анализа митохондријске ДНК у популацији Србије  
Molecular genetic analysis of mitochondrial DNA in population of Serbia

investigated the interactions of the proteins of *SOXB1* group and Wnt signaling pathway in NT2/D1 cells, model system of human teratocarcinoma. We have shown that the inhibition of canonical Wnt signaling pathway downregulates the expression of *SOX2* and other two pluripotency factors *Oct4* and *Nanog*. This leads to decrease in proliferation rate, adhesion and migratory potential of these cells. These findings highlight the therapeutic potential of Wnt signaling inhibitors in the treatment of carcinomas with aberrant Wnt signaling activation.

NT2/D1 cell clones with constitutive overexpression of *SOX2* were used to analyze the oncogenic potential of this gene. This investigation has shown that the overexpression of *SOX2* changed the speed, mode and path of cell migration. In contrast, under these conditions cell adhesion ability was not affected. We have also demonstrated that *SOX2* overexpression has effect on genes implicated in the malignant transformation of the cells, as we detected the increase in the expression levels of tumor suppressor protein p53 and HDM2 oncogene.

It has been shown that the expression of human *SOX18* gene is correlated with regulation of tumor angiogenesis and therefore this gene was marked as potential target in tumor antiangiogenic therapy. However, our research led to novel findings that *SOX18* is implicated in the development and spreading of tumors, independently of tumor angiogenesis. In particular, we have shown that in cervical carcinoma cell lines its expression is under control of SHH (Sonic Hedgehog) signaling pathway and that *SOX18* is involved in the regulation of cancer cells migration and invasion. Moreover, we have presented data that its expression could be modulated by specific agonists or antagonists of SHH signaling. These results marked *SOX18* gene as a potential target in antitumor therapy. Our future investigations will be focused on its role in other types of malignant tumors and its interactions with other signaling pathways involved in oncogenesis.

#### Analysis of potential antitumor and neuroprotective compounds using *in vitro* model systems

Lately, there has been enormous interest in the development of alternative approaches in the prevention and treatment of cancer. Thus, part of our study was focused on the analysis of antitumor effect of natural extracts and bioactive compounds using *in vitro* model systems of human carcinomas. The effects of numerous bioactive compounds, extracted from plants and fungi, on the cellular processes (proliferation, apoptosis, adhesion and migration) as well on the expression of selected *SOX* genes were analyzed.

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy is a common side effect in patients treated with platinum-based drugs. Molecular mechanisms underlying this condition are still unknown. Focus of our investigation is the analysis of potential neuroprotective effects of antioxidants using human neuroblastoma cell line treated with neurotoxic cytostatic cisplatin.

#### Molecular genetic analysis of mitochondrial DNA in population of Serbia

Recently, the analysis of the mitochondrial DNA (mtDNA) diversity in contemporary human population of Serbia has been initiated in our Laboratory. We employed population genetics, phylogenetic and phylogeographic approaches to shed more light on genetic, demographic and other processes that shaped mitochondrial gene pool of our population. Using variability of the hypervariable mtDNA con-



вана је у модел систему хумане ембрионалне плурипотентне 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.

Улога SOX2 гена у процесу неуралне диференцијације испитивана је генерисањем NT2/D1 ћелијских клонова који имају конститутивно повећану експресију овог гена. Показано је да се у условима повећане експресије SOX2 гена добија мањи број зрелих неурона, док број глијалних ћелија остаје непромењен. Такође, утврђено је да се у зрелим неуронима у потпуности гаси експресија SOX2, док поједини зрели астроцити задржавају низак ниво експресије овог протеина. Поред тога наши резултати указују да је и фини баланс између недиференцираног стања и неуралне диференцијације зависан од нивоа експресије SOX2 гена.

Наша истраживања су указала да, поред SOX2, и SOX14 ген има значајну улогу у процесу неуралне диференцијације. Овај ген је експримиран и у хуманим NT2/D1 и у мишијим P19 ембрионалним плурипотентним карциномским ћелијским линијама, а показано је да се ниво експресије SOX14 гена повећава током неуралне диференцијације.

У наставку истраживања регулације експресије SOX3 гена, одређен је епигенетички статус овог гена током неуралне диференцијације NT2/D1 ћелија. Показали смо да је измена хистонских маркера основни механизам одговоран за активацију овог гена током раних фаза неуралне диференцијације. Такође, анализирани су профили хистонских маркера на регулаторним регионима гена фактора плурипотентности SOX2, Oct4 и Nanog. Показано је да су у раним фазама неуралне диференцијације профили хистонских маркера на промоторима ових гена супротни у односу на промотор SOX3 гена.

Наведени резултати доприносе расветљавању молекуларних механизма укључених у регулацију експресије SOX2, SOX3 и SOX14 гена, као и бољем разумевању улоге ових гена у одржавању плурипотентности неуралних прогенитора, одређивању судбине ћелија и процесу неуралне диференцијације.

### SOX гени у онкогенези

Један од нових истраживачких праваца у ЛХМГ представља изучавање улоге SOX гена у онкогенези. Функције одабраних SOX гена анализирани су у различитим *in vitro* моделима хуманих карцинома.

Захваљујући свом пореклу (хумани тератокарцином), NT2/D1 ћелије представљају одличан модел систем за проучавање тератокарцинома. С обзиром на комплементарне улоге Wnt сигналног пута и SOX гена у процесима настанка и прогресије тумора, испитана је интеракција гена SOXB1 групе и Wnt сигналног пута у NT2/D1 ћелијама. Наша истраживања су показала да инхибиција канонског Wnt сигналног пута смањује експресију SOX2 гена и друга два фактора плурипотентности (Oct4 и Nanog), што доводи до смањења пролиферације, адхезије и миграторног потенцијала ових ћелија. Ови резултати имају значај јер указују на терапеутски потенцијал инхибитора канонског Wnt сигналног пута у лечењу малигнух тумора који су настали услед аберантне активности Wnt сигналне каскаде.

Клонови NT2/D1 ћелија који имају конститутивно повећану експресију SOX2 гена такође су послужили као модел систем за испитивање онкогеног потенцијала овог гена. Ова истраживања су показала да се у условима повећане експресије SOX2 мења брзина, начин и путања кретања NT2/D1 ћелија, док ефекат на њихову адхезивну способност није уочен. Такође, повећана експресија SOX2 утиче и на експресију гена одговорних за малигну трансформацију ћелије, па је у овим клоновима детектована повећана експресија тумор супресора p53 и онкогена HDM2.

Од раније је познато да је експресија хуманог SOX18 гена повезана са процесом туморске ангиогенезе. Због улоге у туморској ангиогенези, овај транскрипциони фактор је окарактерисан као потенцијални таргет у туморској антиангиогенетској терапији. Међутим, наша истраживања су показала да SOX18 може своју улогу у одржавању и ширењу тумора остваривати и независно од регулације туморске ангиогенезе. Наиме, показали смо да је у ћелијама пореклом од карцинома грлића материце његова експресија под контролом SHH (Sonic Hedgehog) сигналног пута и да у тим ћелијама SOX18 регулише процес миграције и инвазије. У овом модел систему смо успешно манипулисали експресијом SOX18 гена употребом специфичних агониста и антагониста SHH сигналног пута. Овим смо, први пут, показали да SOX18 ген може бити таргет, не само у антиангиогенетској, већ и у анти-туморској терапији. Наша даља испитивања ће бити усмерена у правцу анализе његове улоге у другим малигнух туморима, као и везе са сигналним путевима који су важни за настанак и ширење малигнух тумора.

### Анализа потенцијалних антитуморских и неуропротективних једињења у *in vitro* модел системима

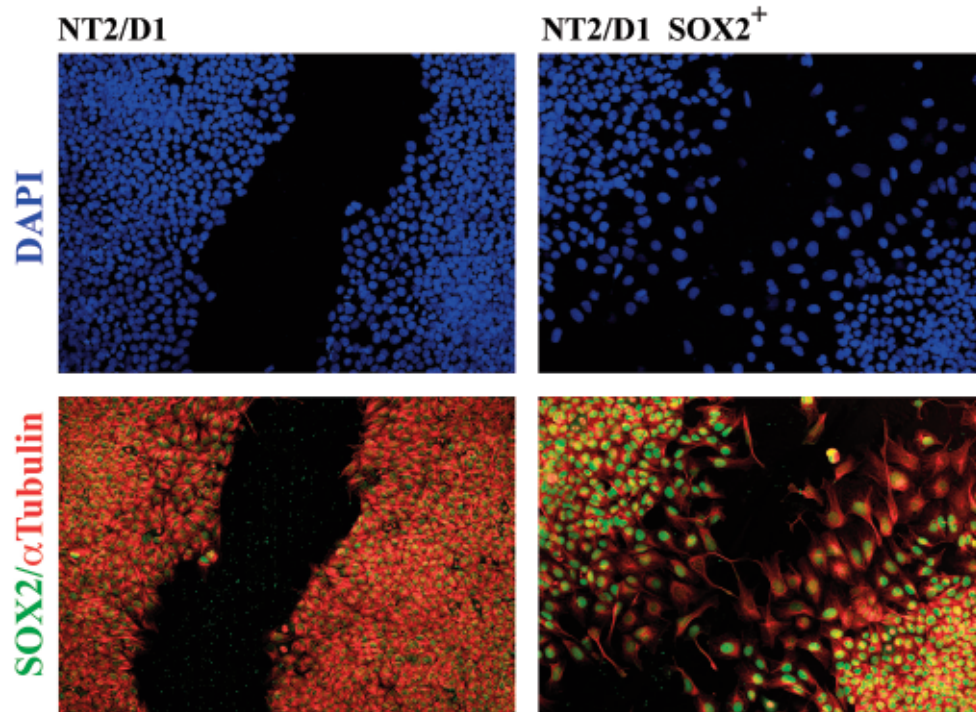
Последњих година постоји велико интересовање за испитивања алтернативних приступа у превенцији и лечењу малигнух обољења. Део наших истраживања био је усмерен на испитивање потенцијалних антитуморских дејстава одабраних природних екстраката и биоактивних једињења на *in vitro* модел системима хуманих карцинома. Анализиран је ефекат бројних биоактивних једињења пореклом из биљака и гљива на основне ћелијске процесе (пролиферација, апоптоза, адхезија, миграција), као и на експресију одабраних SOX гена.



trol region, we defined mtDNA haplogroups in the population of Serbia, assessed their frequencies and estimated levels of mtDNA diversity. We further studied our population in a broader European context in order to provide insights into relations among Serbian and other European populations. We also performed complete sequencing of selected mitogenomes and analyzed them from phylogenetic/phylogeographic aspects to contribute towards better understanding of the evolution of particular mtDNA haplogroups. Also, these analyses enabled us to assess contribution of different historical human migrations throughout the Balkans in shaping extant patterns of variability of the mtDNA gene pool in the population of Serbia.

#### 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 FISH initially introduced for SOX genes mapping was successfully applied for prenatal and postnatal detection of chromosome aberrations. LHMG was the first in Serbia that developed FISH based diagnostics of microdeletion syndromes (Di-George 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.



Конститутивно повећана експресија SOX2 мења брзину, начин и путању кретања хуманих ембрионалних карциномских NT2/D1 ћелија  
The overexpression of SOX2 affects the speed, mode and path of human embryonal carcinoma cell line NT2/D1 migration

#### Identification of sperm DNA fragmentation index (DFI index)

A high level of DNA fragmentation in sperm cells may represent a cause of male infertility that conventional examinations cannot detect. Sperm DNA integrity may help in the clinical diagnosis, management and treatment of male infertility. The test evaluates the susceptibility of sperm DNA to fragmentation by staining sperm with a fluorescent dye, acridine orange.

#### Selected publications

- 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.
- 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.
- 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.
- Mojsin M, Stevanovic M. (2010) PBX1 and MEIS1 up-regulate SOX3 gene expression by direct interaction with a consensus binding site within the basal promoter region. *Biochem. J.* 425:107-116.
- Mojsin M, Vicentic JM, Schwirtlich M, Topalovic V, Stevanovic M. (2014) Quercetin reduces pluripotency, migration and adhesion of human teratocarcinoma cell line NT2/D1 by inhibiting Wnt/beta-catenin signaling. *Food Funct.* 5: 2564-2573.
- Popovic J, Stanisavljevic D, Schwirtlich M, Klajn A, Marjanovic J, Stevanovic M. (2014) Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells. *PLoS One.* 9: e91852.
- Mojsin M, Topalovic V, Vicentic JM, Schwirtlich M, Stanisavljevic D, Drakulic D, Stevanovic M. (2015) Crosstalk between SOXB1 proteins and WNT/β-catenin signaling in NT2/D1 cells. *Histochem. Cell. Biol.* 144, 429-441.
- Davidovic S, Malyarchuk B, Aleksic JM, Derenko M, Topalovic V, Litvinov A, Stevanovic M, Kovacevic-Grujicic N. (2015) Mitochondrial DNA perspective of Serbian genetic diversity. *Am. J. Phys. Anthropol.* 156, 449-465.
- Petrovic I, Miliwojevic M, Popovic J, Schwirtlich M, Rankovic B, Stevanovic M. (2015) SOX18 Is a Novel Target Gene of Hedgehog Signaling in Cervical Carcinoma Cell Lines. *PLoS One.* 10: e0143591.
- Drakulic D, Marjanovic Vicentic J, Schwirtlich M, Tosic J, Krstic A, Klajn A, Stevanovic M. (2015) The overexpression of SOX2 affects the migration of human teratocarcinoma cell line NT2/D1. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 87, 389-404.



Периферне неуропатије индуковане цитостатицима на бази платине представљају често нежељено дејство код пацијената лечених овом групом лекова. Међутим, молекуларни механизми настајања, као и начини ублажавања тегоба још увек нису довољно испитани. У фокусу наших истраживања су антиоксиданси чије потенцијално неуропротективно дејство испитујемо на ћелијама хуманог неуробластома третираним неуротоксичним цитостатиком цисплатином.

### Молекуларно генетичка анализа митохондријске ДНК у популацији Србије

Однедавно, у ЛХМГ је развијен нови правац истраживања усмерен на анализу диверзитета митохондријске ДНК (мтДНК) у савременој популацији Србије са популационо-генетичког, филогенетског и филогеографског аспекта у циљу расветљавања генетичких, демографских и других процеса који су довели до генезе савременог митохондријског генског пула у нашој популацији. На основу варијабилности контролног региона мтДНК дефинисане су мтДНК хаплогрупе, утврђена је њихова учесталост и процењен је ниво мтДНК диверзитета. Поред тога, наша популација је испитивана и у ширем европском контексту, са циљем стицања увида у међусобне односе наше и осталих европских популација. Одабране митохондријске ДНК су комплетно секвенциране и анализирани са филогенетског/филогеографског аспекта ради бољег разумевања еволуције појединих митохондријских хаплогрупа и утврђивања доприноса различитих миграција које су се одвијале кроз територију Балкана у успостављању садашњег обрасца варијабилности митохондријског генског пула популације Србије.

### Примена флуоресцентне *in situ* хибридизације (FISH) у детекцији нумеричких и структурних аберација хромозома

Знање и искуство стечено у основним истраживањима успешно су примењени у молекуларној дијагностици. Тако је техника флуоресцентне *in situ* хибридизације (FISH), првобитно уведена ради мапирања хуманих гена, успешно примењена за детекцију структурних и нумеричких аберација хромозома. ЛХМГ 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.

### Детекција степена фрагментације ДНК у сперматозоидима (ДФИ индекс)

Висок ниво фрагментације ДНК у сперматозоидима један је од узрока мушког инфертилитета који се не може утврдити уобичајеним методама анализе сперме. Испитивање индекса фрагментације ДНК у сперматозоидима омогућава поуздану информацију за процену фертилитета, као и за процену исхода медицински потпомогнуте оплодње. Тест се заснива на диференцијалном бојењу ДНК и омогућава анализу великог броја појединачних сперматозоида из добијеног узорка.

### Одабране публикације

- 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.
- 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.
- 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.
- Mojsin M, Stevanovic M. (2010) PBX1 and MEIS1 up-regulate SOX3 gene expression by direct interaction with a consensus binding site within the basal promoter region. *Biochem. J.* 425:107-116.
- Mojsin M, Vicentic JM, Schwirtlich M, Topalovic V, Stevanovic M. (2014) Quercetin reduces pluripotency, migration and adhesion of human teratocarcinoma cell line NT2/D1 by inhibiting Wnt/beta-catenin signaling. *Food Funct.* 5: 2564-2573.
- Popovic J, Stanisavljevic D, Schwirtlich M, Klajn A, Marjanovic J, Stevanovic M. (2014) Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells. *PLoS One.* 9: e91852.
- Mojsin M, Topalovic V, Vicentic JM, Schwirtlich M, Stanisavljevic D, Drakulic D, Stevanovic M. (2015) Crosstalk between SOXB1 proteins and WNT/ $\beta$ -catenin signaling in NT2/D1 cells. *Histochem. Cell. Biol.* 144, 429-441.
- Davidovic S, Malyarchuk B, Aleksic JM, Derenko M, Topalovic V, Litvinov A, Stevanovic M, Kovacevic-Grujicic N. (2015) Mitochondrial DNA perspective of Serbian genetic diversity. *Am. J. Phys. Anthropol.* 156, 449-465.
- Petrovic I, Milivojevic M, Popovic J, Schwirtlich M, Rankovic B, Stevanovic M. (2015) SOX18 Is a Novel Target Gene of Hedgehog Signaling in Cervical Carcinoma Cell Lines. *PLoS One.* 10: e0143591.
- Drakulic D, Marjanovic Vicentic J, Schwirtlich M, Tomic J, Krstic A, Klajn A, Stevanovic M. (2015) The overexpression of SOX2 affects the migration of human teratocarcinoma cell line NT2/D1. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 87, 389-404.

### 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 просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, 2011–2016



### 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 (fundamental research project No. 173051) Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia, 2011–2016
- 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 (Integrative and interdisciplinary research project No. 47025) Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia, 2011–2016
- SOX and NF-Y genes in the process of neural cell fate determination and differentiation (the collaboration between Serbian Academy of Sciences and Arts and National Academy of Sciences of the Republic of Italy ACCADEMIA NAZIONALE DEI LICEI) 2015–
- Comparative studies on the in vitro neural differentiation of embryonic stem and embryonic carcinoma cells using expression profiling and cell interaction analysis (the collaboration between Serbian Academy of Sciences and Arts and Hungarian Academy of Sciences) 2010–
- Studying the molecular mechanisms involved in maintaining pluripotency and differentiation of stem cells (project No. F-24) Fund for Scientific Research of the Serbian Academy of Sciences and Arts, 2010–
- Regulation of human SOX18 gene expression and its role in angiogenesis (international project No. CRP/YUG07-01). The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), 2008–2010
- Studying the regulation of expression and function of the human SOX genes (fundamental research project No. 143028) Ministry of Science and Environmental Protection, Republic of Serbia, 2006–2010
- Human SOX genes: Studying the structure and regulation of expression (fundamental research project No. 1438) Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 2001–2005
- Retinoic acid induction of SOX3 gene expression (international project No. CRP/YUG99-01). The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Italy, 2000–2002
- Application of molecular techniques in analysis of economic trait loci in cattle (strategic project #S.4.27.48.0001, PP4) Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1998–2000
- FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) in fundamental and clinical investigation (inovation project No. I.3.1429) Ministry of Science and Technology, Republic Serbia, 1997–1998
- Cloning and characterization of human SOX genes (fundamental research project No. 03E11) Ministry of Science and Technology, Republic Serbia, 1996–2000
- SOX3 activation by retinoic acid (international project No. 18876GCS-B09). The Wellcome Trust, UK, 1995–1997
- SOX genes: A new family of genes related to the sex determining gene SRY (international project No. 037356/Z/92). The Wellcome Trust, UK, 1992–1993

### Awards

- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best BSc thesis in the field of molecular biology in Serbia (Dimitrije Krstić, 2004; Slobodan Davidović, 2010)
- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best master thesis in the field of molecular biology in Serbia (Isidora Petrović, 2005; Aleksandar Krstić, 2006)
- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best MSc thesis in the field of molecular biology in Serbia (Jelena Tošić, 2013; Milica Tošić, 2013; Ivana Petrović, 2014; Branislava Ranković, 2014; Jovana Despotović, 2015; Marija Gredić, 2015)
- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best PhD thesis in the field of molecular biology in Serbia (Marija Mojsin, 2008; Nataša Kovačević Grujičić, 2009; Jelena Popović, 2010; Danijela Drakulić, 2011)
- 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





- 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 просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, 2011–2016
- Улога *SOX* и *NF-Y* гена у процесима диференцијације и одређивања судбине ћелије током неуралне диференцијације (билатерална сарадња Српске академије наука и уметности и Националне академије *Dei Lincei*, Италија) 2015–
- Компаративна студија *in vitro* неуралне диференцијације ембрионалних матичних и ембрионалних карциномских ћелија анализом профила генске експресије и међућелијске сигнализације (билатерална сарадња Српске академије наука и уметности и Мађарске академије наука), 2010–2015.
- 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 (CRP/YUG07-01), ICGEB, Италија, 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 (CRP/YUG99-01), ICGEB, Италија, 2000–2002
- 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, РР4). 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 (18876GCS-B09). The Wellcome Trust, UK, 1995–1997
- *SOX* genes: A new family of genes related to the sex determining gene *SRY* (037356/Z/92). The Wellcome Trust, UK, 1992–1993

#### Награде

- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи дипломски рад из области молекуларне биологије у Србији (Димитрије Крстић, 2004; Слободан Давидовић, 2010)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи магистарски рад из области молекуларне биологије у Србији (Исидора Петровић, 2005; Александар Крстић, 2006)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи мастер рад из области молекуларне биологије у Србији (Јелена Тошић, 2013; Милица Тошић, 2013; Ивана Петровић, 2014; Бранислава Ранковић, 2014; Јована Деспотовић, 2015; Марија Гредић, 2015)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље докторске дисертације из области молекуларне биологије у Србији (Марија Мојсин, 2008; Наташа Ковачевић Грујичић, 2009; Јелена Поповић, 2010; Данијела Дракулић, 2011)
- 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





Првобитна истраживања Лабораторије за молекуларну генетику и екологију микроорганизама (ЛМГЕМ) била су усмерена ка молекуларној генетици актиномицета, бактерија произвођача аминогликозида и проучавању механизма резистенције на сопствене токсичне продукте путем метилације места деловања антибиотика, као и на регулацију експресије гена одговорних за резистенцију. Лабораторија је у току свог развоја постепено проширивала интересовања од фундаменталних ка применљивим истраживањима и биотехнологији, фокусирајући се на потрагу за новим биоактивним једињењима, ензимима и генима, као и на карактеризацију нових сојева микроорганизама. У овоме, главни ресурс ЛМГЕМ представља колекција микроорганизама из различитих срединских узорака. ЛМГЕМ ради и на развоју процеса у којима бактеријски продукти или целе бактерије могу бити коришћени у биокатализи, биотехнологији и добијању нових материјала.

Актуелни пројекти оријентисани су ка новим биоактивним једињењима, њиховој екофизиолошкој улози, развоју нових антибактеријских, антифунгалних и антиканцерских терапеутика, као и ка примени бактеријских ензима у зеленим технологијама.

The initial research of Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology (LMMGE) has been focused on the molecular genetics of actinomycetes, bacterial producers of aminoglycoside antibiotics, study of the mechanisms of bacterial resistance to their own toxic products by methylation of antibiotics site of action, and the regulation of expression of genes responsible for resistance. The Laboratory has gradually shifted its research interests from the fundamental to applicative research and biotechnology focusing on new bioactive compounds, enzymes and genes, and characterization of new bacterial strains. For this purposes, the main resource of LMMGE represents a collection of microorganisms from various environmental samples. LMMGE also develops processes for the application of bacterial products in biocatalysis and biotechnology and in production of the new materials such as bioplastic.

Current Laboratory projects are focused on the new bioactive compounds, their ecophysiological role and their potential in the development of new antibacterial, antifungal and anticancer therapeutics, as well as the application of bacterial enzymes in green technologies.



## Лабораторија за молекуларну генетику и екологију микроорганизама

### Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology



**Руководилац**  
др Бранка Васиљевић  
научни саветник  
**Head**  
Branka Vasiljević, PhD  
Principal Research Fellow



др Ивана Морић  
научни сарадник  
Ivana Morić, PhD  
Research Associate



др Јасмина Никодиновић Руњић  
научни саветник  
Jasmina Nikodinović Runić, PhD  
Principal Research Fellow



др Татјана Илић-Томић  
научни сарадник  
Tatjana Ilić-Tomić, PhD  
Research Associate



др Лидија Ђокић  
научни сарадник  
Lidija Đokić, PhD  
Research Associate



др Лидија Шенеровић  
научни сарадник  
Lidija Šenerović, PhD  
Research Associate



др Нада Станковић  
научни сарадник  
Nada Stanković, PhD  
Research Associate



др Сања Јеремић  
научни сарадник  
Sanja Jeremić, PhD  
Research Associate



др Александар Павић  
научни сарадник  
Aleksandar Pavić, PhD  
Research Associate



Јелена Радивојевић  
истраживач-сарадник  
Jelena Radivojević, MSc  
Research Assistant



др Сандра Војновић  
научни сарадник  
Sandra Vojnović, PhD  
Research Associate



Мина Мандић  
истраживач-сарадник  
Mina Mandić, MSc  
Research Assistant



др вет. Душан Миливојевић  
истраживач-сарадник  
Dušan Milivojević, DVM  
Research Assistant



дипл. инг. Марија Мојићевић  
истраживач-приправник  
Ing. Marija Mojićević, MSc  
Research Trainee

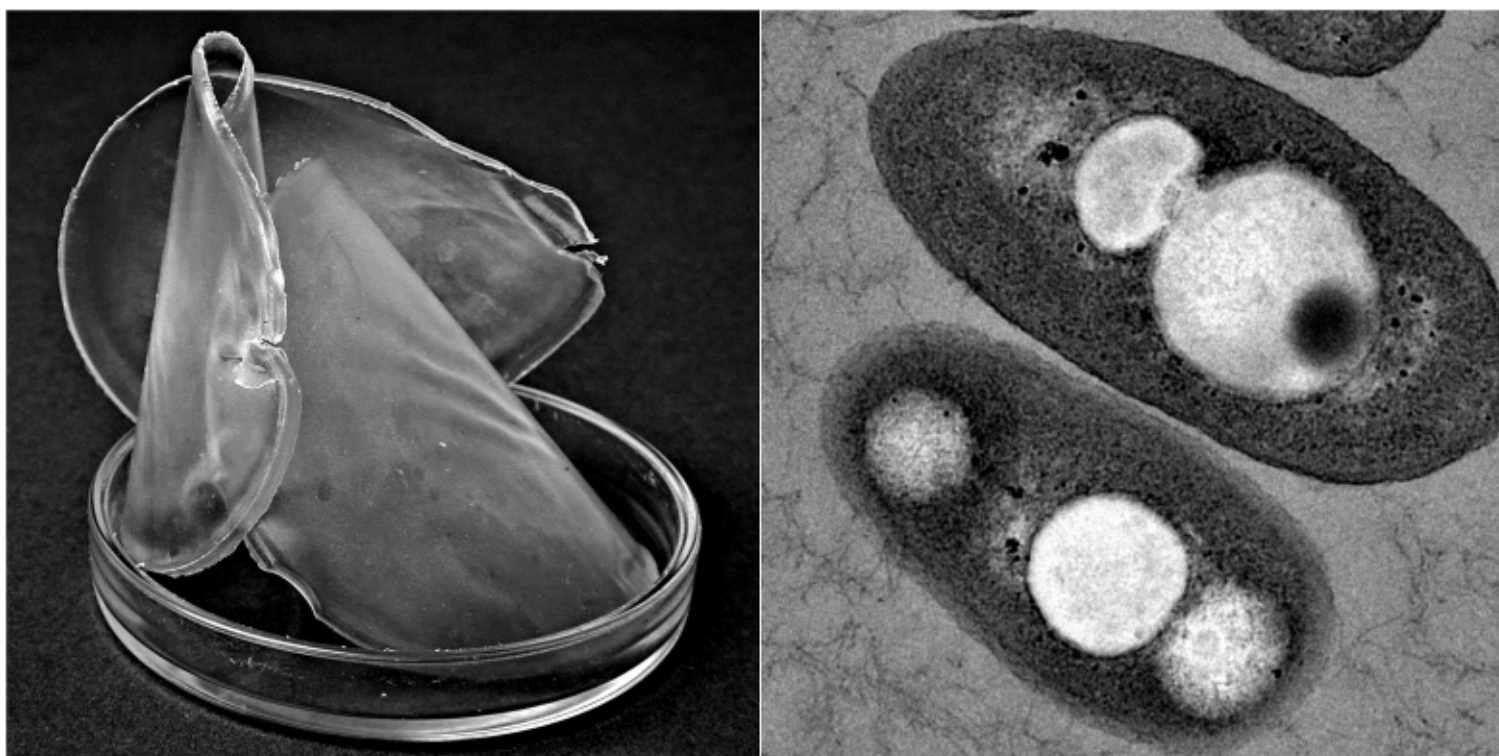


## Research focus

Laboratory for Microbial Molecular Genetics and Ecology (LMMGE) (previously Laboratory for Molecular Genetics of Actinomycetes) became independent research unit in 1998. Initially, research focus of the Laboratory was on molecular genetics of actinomycetes, producers of secondary metabolites. One of the first aims of the Laboratory was development of methods of the protoplasts transformation of and genetic manipulation of bacteria of the genus *Micromonospora* (family *Actinomycetes*). Elucidation of the mechanisms of resistance in actinomycetes aminoglycoside producers commenced with the cloning of *sgm* 16S rRNA methyltransferase from *M. zionensis*, producer of antibiotics G-52. Sgm protein methylates the site of action of aminoglycosides in the small ribosomal subunit providing resistance to its carrier. Further study of the mechanism of regulation of *sgm* revealed that its expression is regulated at the transcriptional level by two promoters, and that this gene is additionally regulated at the translational level. We proposed a negative autoregulation model that includes interference of methyltransferase with the initiation of translation. At the same time we were studying both the regulation of gene expression *grmA* from *Micromonospora purpurea*, producer of gentamicin complex and the negative autoregulation gene expression mechanism via regulatory primary and/or secondary structures in the 5' untranslated region (UTR) of the mRNA of *kgmB* gene from *Streptomyces tenebrarius*, producer of nebramycin complex, that has been predicted *in silico*, but not confirmed *in vitro*. The exact site of action of Sgm, KgmB and GrmA methyltransferases that methylate G1405 positioned in the A site of the 16S rRNA molecule has been determined in the collaboration with the group from Manchester Interdisciplinary Biocentre of the Manchester University, UK (WellcomeTrust project). In this project the two-domain structural organization of Sgm methyltransferase was established and amino acids responsible for catalytic activity and cofactors binding were identified.

For over fifteen years LMMGE collects actinomycetes from various environmental samples, primarily from soil. These isolates are foundation of the microorganism collection that is continuously growing. Environmental strain collection represents the fundamental resource of LMMGE counting today over 1000 isolates. As LMMGE developed, its research interests expanded on molecular genetics of other environmental microorganisms, especially beneficial bacteria, and microbial diversity of various habitats.

The studies on the microbial diversity in LMMGE started with analysis of samples from the rhizosphere of two endemorelict plants - *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*, and continued with the samples of river sediments under the influence of Pancevo petrochemical industry effluents, surface and underground sediments, as well as and highly acidic waters of Lake Robule near tailings of the copper mine Bor. Also, objects of cultural heritage subject to biodeterioration including painting "The Battle of Kosovo" by Petar Lubarda, icon woven on silk from the Legacy of Petar Lubarda, and the books from the National Library of Serbia Heritage Collection were analyzed in the framework of the UNESCO project AMARCORD. Whether it is about the pristine environments, potentially contaminated sites with



Бактеријска биопластика од полихидроксиалканоата (PHA) које неке врсте бактерија синтетишу и акумулирају у виду унутарћелијских гранула.  
Bacterial bioplastics - polyhydroxyalkanoates (PHA) that certain bacteria produce and accumulate as intracellular granules.

## Фокус истраживања

Лабораторија за молекуларну генетику и екологију микроорганизама (ЛМГЕМ) која се раније звала Лабораторија за молекуларну генетику актиномицета, постала је независна истраживачка јединица 1998. године. Првобитни истраживачки интерес ЛМГЕМ била је молекуларна генетика актиномицета, бактерија познатих по производњи секундарних метаболита. Један од првих задатака био је развој метода за трансформацију протопласта и манипулацију генетичким материјалом бактерија рода *Micromonospora* (фамилија *Actinomycetes*). Расветљавање механизма резистенције код актиномицета произвођача аминогликозида, започето је клонирањем *sgm* 16S рРНК метилтрансферазе из *Micromonospora zionensis*, произвођача антибиотика G-52. Sgm протеин метилује место деловања аминогликозида у малој рибозомалној субјединици обезбеђујући 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. Предложили смо модел негативне ауторегулације који укључује интерференцију метилтрансферазе са инцијацијом транслације. Истовремено смо се бавили проучавањем регулације експресије *grmA* гена из *M. purpurea* која производи гентамицински комплекс, као и механизмом негативне ауторегулације експресије преко регулаторних примарних и/или секундарних структура у 5' нетранслатирајућем региону иРНК *kgmB* гена из *Streptomyces tenebrarius*, произвођача небрамицинског комплекса који је предвиђен *in silico*, али није доказан *in vitro*. Одређивање тачног места деловања Sgm, KgmB и GrmA метилтрансфераза које метилују G1405 у оквиру A места на 16S рРНК молекулу показано је у току пројектне сарадње са лабораторијом из Манчестерског интердисциплинарног биоцентра Универзитета у Манчестеру, Велика Британија (WellcomeTrust пројекат). Такође је утврђена дводоменска структурна организација Sgm метилтрансферазе и идентификоване су аминокиселине одговорне за везивање кофактора и каталитичку активност.

ЛМГЕМ више од петнаест година прикупља актиномицете из различитих срединских узорака, пре свега из земљишта. Ови изолати чине основу колекције микроорганизама коју ЛМГЕМ и данас допуњује. Колекција срединских изолата представља један од фундаменталних истраживачких ресурса и тренутно броји преко 1000 сојева.

Како се ЛМГЕМ развијала тако се и њено истраживачко интересовање проширило на молекуларну генетику других срединских микроорганизама, а посебно корисних бактерија, као и на изучавање микробиолошког диверзитета различитих станишта.

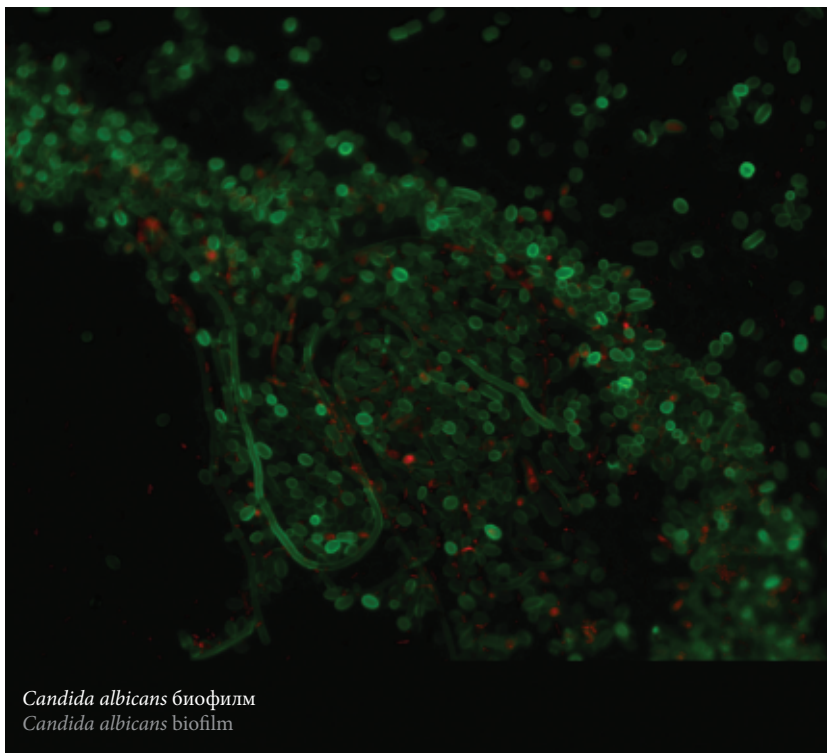
Изучавање микробиолошког диверзитета у ЛМГЕМ започело је анализом узорака из ризосфера ендемо-реликтних биљака *Ramonda serbica* и *Ramonda nathaliae*, а наставило се анализом узорака речних седимената под утицајем ефлуената петрохемијске индустрије Панчево, површинских и подземних седимената као и вода екстремно киселог језера Робуле у подножју јаловишта рудника бакра Бор. Такође, анализирана су и културни добра подложна биодетериорацији укључујући слику „Косовски бој” Петра Лубарде и икону ткану на свили из Легата Петра Лубарде, као и књиге из колекције Културних добара од великог значаја Народне библиотеке Србије које су анализирани у оквиру Унесковог пројекта AMARCORD. Било да се ради о нетакнутој при-

роди која није изложена антропогеном дејству, локалитетима који су потенцијално контаминирани ароматичним угљоводонцима или тешким металима, екстремним срединама или угроженим културним добрима, микробиолошки диверзитет ових различитих станишта је изучаван применом два комплементарна приступа — класичним микробиолошким методама, које подразумевају изолацију и култивацију бактерија, и метагеномским приступом. На овај начин је добијена комплетнија слика бактеријског диверзитета, а истовремено и потенцијално корисни изолати који производе различите метаболите или ензиме, односно који су интересантни због могуће употребе у биоремедијацији и биотехнологији.

Логичан наставак развоја ЛМГЕМ је изоловање нових гена и ензима из корисних микроорганизама и усмеравање истраживања ка потрази за новим биоактивним једињењима и ензимима као и њиховој примени у развијању терапеутика, односно биокатализи и биотехнологији, као надградњи фундаменталних истраживања.

### Биоактивна једињења

Један од првих корака ЛМГЕМ у детекцији биоактивних једињења био је развијење адекватног биолошког есеја за



*Candida albicans* биофилм  
*Candida albicans* biofilm

elevated concentration of aromatic hydrocarbons or heavy metals, extreme habitats, or endangered cultural property, the study of microbial diversity in different habitats is always designed to apply two complementary approaches - the traditional microbiological method of the isolation and cultivation of bacteria, and the metagenomic approach. In this way it is possible to obtain both more comprehensive picture on bacterial diversity, and to collect potentially useful strains that produce different metabolites, enzymes, or are themselves interesting for possible use in bioremediation and biotechnological processes.

The logical continuation of the development of LMMGE was the isolation of novel genes and enzymes of beneficial microorganisms. That guided research towards the search for new bioactive compounds and enzymes as well as their application in the development of therapeutics, in biocatalysis and biotechnology as an extension of fundamental research.

### Bioactive compounds

One of the first steps of LMMGE in efficient search of collection of environmental isolates for the production of bioactive secondary metabolites was development of a adequate biological assay. An assay aimed on search for producers of polyketide macrolide antibiotics and immunosuppressants, products of polyketide synthase type I (PKS I) was based on baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain FAV20. Using this assay and designed degenerate primers for PCR detection a number of interesting strains were isolated from our Collection. They have been shown to belong to the genus *Streptomyces*, renowned producer of antibiotics, antifungal, immunosuppressant, and anticancer compounds. The strain MS405 which has been shown to represent a new species named *Streptomyces durmitorensis* sp. nov. produces a new family of polyene macrolides. In cooperation with the Czech Republic Academy of Sciences Institute of Microbiology it was discovered that the key compound in this family is 32,33-didehydroroflamicoin (DDHR) which has been shown to have activity against human and plant fungal pathogens, and whose stable production was optimized in LMMGE. Yet another *Streptomyces* strain - JS520 produces an exceptionally high amount of undecylprodigiosin (UP), tripyrrolic purple pigment that protects its producer from free radicals and UV radiation and demonstrates anticancer activity. We have managed to further improve its antitumor activity by complexing UP with gold nanoparticles. Designing complexes with metals is one of the directions of research development of bioactive compounds application that introduces LMMGE into an exciting area of nanomaterials. Sequencing complete genome of a novel strain *Streptomyces griseus* NP10 represents a new LMMGE resource and a starting point in genome based search for the genes for bioactive compounds (genome mining). This strain accumulates a large amount of free fatty acids, some of which have not been detected in the living world! For the assesment of activity of isolated compounds a wide range of biotests that include microorganisms, human cell culture, and zebrafish (*Danio rerio*) embryos is used. As a part of our award-winning project (ESCMID/FEMS Research Fellowship Award) we are performing targeted search of the collection of natural isolates for *Streptomyces* strains producers of small molecules that influence the formation of bacterial biofilms modifying their quorum sensing signaling. These bioactive compounds represent the basis for a new generation of antibacterial agents that interfere with bacterial virulence rather than viability, not imposing thus selective pressure that would have resulted in the development of resistance. With this approach we isolated strain *Streptomyces* sp. BV152.1 producer of non-bactericidal rhamnolipids with the broad spectrum of anti-biofilm activity. Parallel to testing natural bioactive molecules we test effects of compounds from chemically synthesized libraries on bacterial communication and biofilms, with a special stress on already proven biologically active compounds, since repurposing of existing therapeutics considerably speeds up drug developing process. During the course of study of bioactive various aspects of bioactive compounds we have established a long-standing successful cooperation with groups in Chemistry from the Faculty of Chemistry and Faculty of Pharmacy of University of Belgrade, Faculty of Science and Mathematics of University of Nis and Faculty of Science and Mathematics of University of Kragujevac.

### Biopolymers and biocatalysis

Possessing the collection of microorganisms allowed LMMGE to commit to study of biotechnological application of bacterial enzymes. Using traditional microbiological methods we have isolated from environmental samples bacteria capable of decomposing high concentration of phenols and other aromatic compounds due to the presence of very efficient enzymes involved in phenol degradation pathways. A strain of *Bacillus* sp. PS11 has shown that it can decompose 2 grams of phenol per kilogram of soil within just four days. It has been shown that this strain is able to grow on 16 different aromatic compounds and it is certainly a good candidate for use in bioremediation, as well as the another isolated strain - *Pseudomonas* sp. TN301. Strain TN 301 has the capability of converting a wide range of poly- and monoaromatic compounds in biodegradable polymer polyhydroxyalkanoate (PHA), or bioplastic. Isolation of strains that can accumulate PHA introduced LMMGE to the field of study of new biopolymer materials and cooperation with Biocatalysis Laboratory at University College Dublin, Ireland. Bioplastic has a broad application from the production of packaging to medical implants and is derived from renewable resources (such as glucose and ethanol) but also from waste materials. In our research we use it as a carrier for antibiotics and anticancer compounds thereby modifying their effect, and further broadening spectrum of bioplastics application. In a frame of yet another successful ESCMID Research project, LMMGE is focused on improvement of antifungal properties of bioplastics by simple chemical transformations of its monomeric units to create bioplastic with antifungal properties. In these biotechnological processes a key role belongs to new, industrially applicable enzymes, which are in the focus of LMMGE research today - lipases, tautomerases, cellulases, reductases.

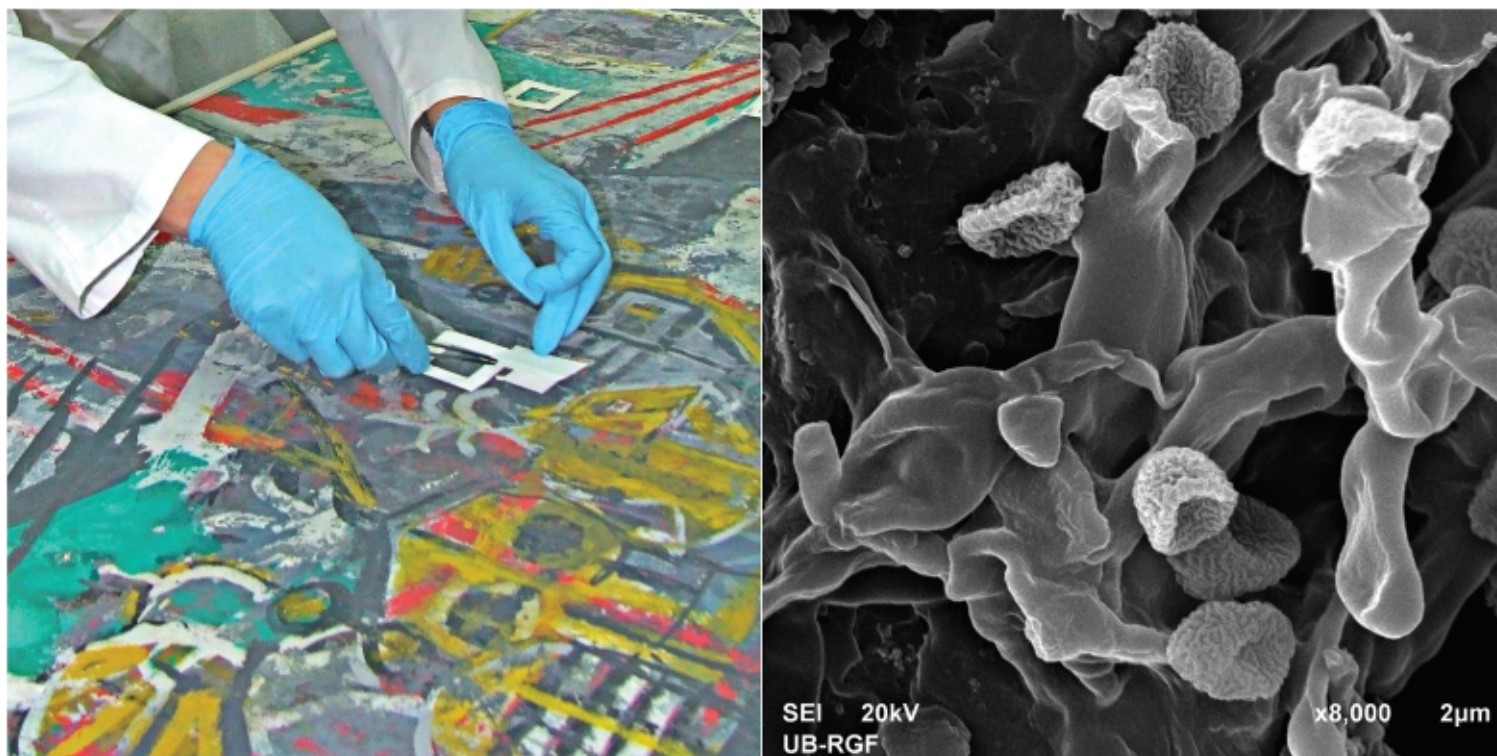


циљано претраживање колекције срединских изолата. Есеј за претраживање усмерено ка детекцији произвођача поликетидних макролидних антибиотика и имуносупресора, продуката поликетид синтаза типа I (PKS I), био је базиран на мутираном соју пекарског квасца *Saccharomyces cerevisiae* FAV20. Користећи биолошки есеј и изрођене прајмере дизајниране за PCR детекцију издвојено је више интересантних сојева за које је показано да припадају роду *Streptomyces* познатом по производњи пре свега антибиотика али и имуносупресора, антифунгалних и антиканцерских једињења. Тако сој MS405, који представља нову врсту *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., производи до сада неокарактерисану фамилију полиенских макролида. У сарадњи са Институтом за микробиологију чешке Академије наука установљено је да је кључно једињење ове фамилије 32,33-дидехидророфламикоин (DDHR), чија је стабилна производња оптимизирана, и за које је показано да има активност према хуманим и биљним фунгалним патогенима. Сој *Streptomyces* sp. JS520 производи, с друге стране, изузетно велике количине ундецилпродигиозина (UP), љубичастог трипиролног пигмента који штити бактерију произвођача од слободних радикала и UV зрачења, а показује и антиканцерску активност коју смо успели да побољшамо комплексовањем са наночестицама злата. Комплексовање са металима је један од праваца развоја истраживања биоактивних једињења и њихове примене које је увело ЛМГЕМ у узбудљиву област наноматеријала. Секвенца генома новог соја из колекције, *Streptomyces griseus* NP10, представља нови ресурс ЛМГЕМ и полазну тачку за нови приступ у потрази за генима укљученим у производњу биоактивних једињења (genome mining). Овај сој акумулира велике количине слободних масних киселина од којих неке нису детектоване у живом свету! За тестирање биолошке активности изолованих једињења користимо широку палету тестова који укључују микроорганизме, хумане ћелије у култури, ембрионе зебрица (*Danio rerio*). У оквиру нашег награђеног пројекта (ESCMID/FEMS Research Fellowship награда) колекција природних изолата се поново циљано претражује, трага се за произвођачима малих молекула који утичу на формирање бактеријских и мешовитих биофилмова, односно на модификацију бактеријске комуникације (quorum sensing). Ова биоактивна једињења представљају основ за нову генерацију антибактеријских агенса који утичу на активност патогена, а да их при томе не убијају, те не намећу селективни притисак који би за последицу имао развој резистенција на терапеутик. Оваквим приступом изолован је сој *Streptomyces* sp. BV152.1 који производи рамнолипиде са анти-биофилм активношћу широког спектра дејства који не утичу на вијабилност бактерија. Паралелно са природним биоактивним молекулима тести-



Изолати *Streptomyces* sp. из јединствене Лабораторијске колекције и њихови екстракти, тестирани на биолошку активност  
*Streptomyces* sp. isolates from unique Laboratory collection and their extracts tested for bioactivity





Узимање узорка за микробиолошку анализу и SEM микрографија микроорганизама у непосредном контакту са површином слике („Косовски бој”, Петар Лубарда)  
Sampling for microbial analysis and SEM image of microorganism in close contact with painting surface (“Battle of Kosovo”, Petar Lubarda)

Cloning and identification of potent lipase from strains of *Pseudomonas putida* obtained from the exchange with a Dublin group will enable the synthesis of bioplastics from waste oils in a single genetically engineered bacterial cell. In LMMGE extensive research has been done on the *P. putida* strain producer of 4-oxalocrotonate tautomerase that conducts Michael's addition of aldehydes to nitrostyrene. We managed, by heterologous expression in *Escherichia coli*, to increase efficiency of this enzyme six fold obtaining at the same time purer product that is the starting compounds for the synthesis of analogs of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) which are used in the treatment of neurological and mental disorders. Thermophilic strain *Laceyella* sp. was isolated in LMMGE and its cellulase was characterized. Thermostable cellulase would have many advantages over conventional ones in the treatment of cellulosic materials in the production of bioethanol, which is the first step for the production of biofuels. Imin reductases are another, relatively new and less studied group of enzymes that we search our collection for, using specific PCR-based assay was designed in LMMGE. These stereospecific enzymes could have great application in the synthesis of therapeutics.

The application of all aforementioned bacterial enzymes and developing processes for their use, which would result in the replacement of chemical and industrial processes with cleaner and safer environmentally friendly biotechnological processes, is one of the long-term objectives of the LMMGE together with isolation and application of the novel bioactive compounds.

#### Selected publications

- Savic M, Lovric J, Ilic-Tomic T, Vasiljevic B, Conn G. (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.
- Narancic T, Djokic L, Kenny ST, O'Connor K, Nikodinovic-Runic J, Vasiljevic B. (2012) Metabolic versatility of Gram-positive microbial isolates from contaminated river sediments. *J. Hazard. Mater.* 215-216, 243-51.
- Narancic T, Radivojevic J, Jovanovic P, Francuski D, Bigovic M, Maslak V, Savic V, Vasiljevic B, O'Connor K, Nikodinovic-Runic J. (2013) Highly efficient Michael-type addition of acetaldehyde to  $\beta$ -nitrostyrenes by whole resting cells of *Escherichia coli* expressing 4-oxalocrotonate tautomerase. *Bioresour. Technol.* 142, 462-468.
- Stankovic N, Senerovic L, Ilic-Tomic T, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J. (2014) Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3841-3858.
- Nikodinovic-Runic J, Mojic M, Kang Y, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Vasiljevic B, Stamenkovic V, Senerovic L. (2014) Undecylprodigiosin conjugated monodisperse gold nanoparticles efficiently cause apoptosis in colon cancer cells *in vitro*. *J. Mater. Chem.* 21, 3271 - 3281.
- Radivojevic J, Minovski G, Senerovic L, O'Connor K, Jovanovic P, Savic V, Tokic-Vujosevic Z, Nikodinovic-Runic J, Maslak V. (2014) Synthesis of  $\gamma$ -nitroaldehydes containing quaternary carbon in  $\alpha$ -position using 4-oxalocrotonate tautomerase whole-cell biocatalyst. *RSC Adv.* 4, 60502-605010.





рају се ефекти једињења из библиотека хемијски синтетисаних супстанци на комуникацију микроорганизама и биофилмове, са посебним акцентом на једињењима са већ доказаном биолошком активношћу јер пренамена постојећих терапеутика знатно убрзала развој нових антимикробиолошких агенаса. Захваљујући изучавању различитих аспеката биоактивних једињења успоставили смо вишегодишњу успешну сарадњу са истраживачким групама са Хемијског факултета и Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, као и Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу и Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

### Биополимери и биокатализа

Колекција микроорганизама коју ЛМГЕМ поседује омогућава изучавање биотехнолошке примене бактеријских ензима. Класичним микробиолошким методама из срединских узорак изоловане су бактерије способне да разграђују високе концентрације фенола као и других ароматичних једињења захваљујући присуству веома ефикасних ензима који учествују у путевима разградње фенола. За сој *Bacillus* sp. PS11 показано је да може да разгради 2 грама фенола по килограму земље у року од четири дана, као и да може да расте на 16 различитих ароматичних једињења, што га чини добрим кандидатом за употребу у биоремедијацији. Други сој који има потенцијал за употребу у биоремедијацији је *Pseudomonas* sp. TN301. Он има способност конверзије широког спектра полиароматичних и моноароматичних једињења у биодеградабилне полимере, полихидроксиалканоате (РНА), односно биопластику. Изолација сојева који могу да акумулирају РНА увела је ЛМГЕМ у област изучавања нових биополимерних материјала и у сарадњу са Лабораторијом за биокатализу Даблинског универзитетског колеџа у Ирској. Биопластика се добија из обновљивих ресурса (глукоза, етанол) али и из отпадних материјала и има широку примену — од производње амбалаже до медицинских имплантата. У нашим истраживањима је корисимо као носач за биоактивна једињења чиме модификујемо њихов ефекат и ширимо поље примене биопластике. Поред тога покушавамо да једноставним хемијским трансформацијама мономерних јединица од којих је изграђена биопластика у оквиру још једног успешног ESCMID Research пројекта побољшамо њене особине и добијемо биопластику са антифунгалним дејством. У овим биотехнолошким процесима кључну улогу имају нови, индустријски значајни ензими који су данас у фокусу истраживања ЛМГЕМ — липазе, таутомеразе, целулазе, редуктазе. Клонирање и идентификација потентних липаза пореклом из сојева *Pseudomonas putida*, добијених у оквиру сарадње са групом из Даблина, омогућило би синтезу биопластике из отпадних уља у једној, генетски модификованој, бактеријској ћелији. У ЛМГЕМ се интензивно ради и на соју *Pseudomonas putida*, произвођачу 4-оксалокротонат таутомеразе која врши Мајклову адисију алдехида на нитростирене. Успели смо да хетерологом експресијом овог ензима у *Escherichia coli* повећамо шест пута његову ефикасност при чему је добијен и чистији производ који је полазно једињење за синтезу аналога  $\gamma$ -аминобутиричне киселине (ГАВА), једињења која се користе у терапији неуролошких и менталних поремећаја. Из лабораторијске колекције је окарактерисана и целулаза из термофилног соја *Laceyella* sp. CR623. Термостабилне целулазе су много боље од конвенционалних за третман целулозног материјала у продукцији биоетанола који је први корак у продукцији биогорива. Имин редуктазе су новија група недовољно истражених ензима на чије присуство се врши претраживање богате колекције, а помоћу PCR реакција са изрођеним прајмерима, још једним есејем који је осмишљен у ЛМГЕМ. Ови стереоспецифични ензими имали би велику примену у синтези терапеутика.

Примена бактеријских ензима и развијање процеса за њихово коришћење која би резултирала заменом хемијских и индустријских процеса чистијим и безбеднијим еколошки прихватљивим биотехнолошким процесима — представља један од дугорочних циљева ЛМГЕМ, баш као и потрага за новим биоактивним једињењима и развојем ефикаснијих начина њихове апликације.

### Одабране публикације

- Savic M, Lovric J, Ilic-Tomic T, Vasiljevic B, Conn G. (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.
- Narancic T, Djokic L, Kenny ST, O'Connor K, Nikodinovic-Runic J, Vasiljevic B. (2012) Metabolic versatility of Gram-positive microbial isolates from contaminated river sediments. *J.Hazard. Mater.* 215-216, 243-51.
- Narancic T, Radivojevic J, Jovanovic P, Francuski D, Bigovic M, Maslak V, Savic V, Vasiljevic B, O'Connor K, Nikodinovic-Runic J. (2013) Highly efficient Michael-type addition of acetaldehyde to  $\beta$ -nitrostyrenes by whole resting cells of *Escherichia coli* expressing 4-oxalocrotonate tautomerase. *Bioresour. Technol.* 142, 462-468.
- Stankovic N, Senerovic L, Ilic-Tomic T, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J. (2014) Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 98, 3841-3858.
- Nikodinovic-Runic J, Mojic M, Kang Y, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Vasiljevic B, Stamenkovic V, Senerovic L. (2014) Undecylprodigiosin conjugated monodisperse gold nanoparticles efficiently cause apoptosis in colon cancer cells *in vitro*. *J. Mater. Chem.* 21, 3271 - 3281.
- Radivojevic J, Minovski G, Senerovic L, O'Connor K, Jovanovic P, Savic V, Tokic-Vujosevic Z, Nikodinovic-Runic J, Maslak V. (2014) Synthesis of  $\gamma$ -nitroaldehydes containing quaternary carbon in  $\alpha$ -position using 4-oxalocrotonate tautomerase whole-cell biocatalyst. *RSC Adv.* 4, 60502-605010.
- Ilic-Tomic T, Gencic M, Zivkovic M, Vasiljevic B, Djokic L, Nikodinovic-Runic J, Radulovic N. (2015) Structural diversity and possible functional roles of free fatty acids of the novel soil isolate *Streptomyces* sp. NP10. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 99, 4815-4833.



- Ilic-Tomic T, Gencic M, Zivkovic M, Vasiljevic B, Djokic L, Nikodinovic-Runic J, Radulovic N. (2015) Structural diversity and possible functional roles of free fatty acids of the novel soil isolate *Streptomyces* sp. NP10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4815-4833.
- Pavic A, Ilic-Tomic T, Pacevski A, Nedeljkovic T, Vasiljevic B, Moric I. (2015) Diversity and biodeteriorative potential of bacterial isolates from deteriorated modern combined-technique canvas painting. *Int. Biodeter. Biodeg.* 97, 40-50.
- Senerovic L, Zivkovic M, Veselinovic A, Pavic A, Djuran M, Rajkovic S, Nikodinovic-Runic J. (2015) Synthesis and evaluation of series of diazine-bridged dinuclear platinum(II) complexes through in vitro toxicity and molecular modeling: correlation between structure and activity of Pt(II) Complexes. *J. Med. Chem.* 58, 1442-1451.
- Savic N, Milivojevic D, Glisic B, Ilic-Tomic T, Veselinovic J, Pavic A, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J, Djuran M. (2016) A comparative antimicrobial and toxicological study of gold(III) and silver(I) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocycles: synergistic activity and improved selectivity index of Au(III)/Ag(I) complexes mixture. *RSC Adv.* 6, 13193-13206.

### Projects

- Molecular genetics of micromonospora, within project structural and functional analysis of genes in industrial microorganisms (Project No. 03E10 funded by Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 1996–2000)
- Molecular genetics of microorganisms and expression of industrially important genes (Project No. 1512 funded by Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, 2001 – 2005)
- Regulation of gene expression in antibiotic producer *Streptomyces tenebrarius* (Project No. CRP/YUG00-05 funded by ICGEB, 2001 – 2003)
- Expression and regulation of pharmaceutically important genes in microorganisms (Project No. 143056 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 (Project No. 078374 funded by Wellcome Trust, 2006 – 2008)
- Search for new bioactive secondary metabolites (Bilateral Cooperation between the Academy of Sciences of the Czech Republic and the Serbian Academy of Sciences and Arts, 2006 – 2010).
- Microbial diversity in the copper mine Bor (Project No. CRP/YUG09-03 funded by ICGEB, 2010 – 2012)
- Microbial diversity study and characterization of beneficial environmental microorganisms (Project No. 173048 funded by Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia, 2011 – 2015)
- Assessing and monitoring microbial communities and their Impact on documentary heritage in collection of national library of Serbia - Preserving the memory of the world (AMARCORD) (Project No. 590-2/2012 funded by UNESCO, 2013)
- Combinatorial libraries of heterogeneous catalysts, natural products, modified natural products and their analogues: the way to new biologically active agents (Project No. 172061 funded by Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia, 2011–2015)
- Functionalisation of bacterial polymers (Project No. BP2013 funded by Bioplastech Ltd., Dublin, Ireland, 2013–)
- Structurally guided identification of novel pharmacophores targeting *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm formation (funded by ESCMID Resarch Grant, 2015 – 2016)
- Development of biopolymeric formulation of antifungal polyenes using medium chain length polyhydroxyalkanoate (PHA): validation against superficial mycoses (funded by ESCMID Resarch Grant, 2015 – 2016)

### Awards

- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best BSc thesis in the field of molecular biology in Serbia (Tanja Narančić, 2006; Sanja Bajkić, 2007)
- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best master thesis in the field of molecular biology in Serbia (Jelena Spasić, 2015)
- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best MSc thesis in the field of molecular biology in Serbia (Lidija Šenerović, 2005)
- Award of “Goran Ljubijankić” Foundation for best PhD thesis in the field of molecular biology in Serbia (Tatjana Ilić-Tomić, 2010; Sandra Vojnović, 2011; Nada Stanković, 2012)
- ESCMID/FEMS Research Fellowship 2015 Best Project Proposal Award: Lidija Šenerović (2015)



- Pavic A, Ilic-Tomic T, Pacevski A, Nedeljkovic T, Vasiljevic B, Moric I. (2015) Diversity and biodeteriorative potential of bacterial isolates from deteriorated modern combined-technique canvas painting. *Int.Biodeter.Biodeg.*97, 40-50.
- Senerovic L, Zivkovic M, Veselinovic A, Pavic A, Djuran M, Rajkovic S, Nikodinovic-Runic J. (2015) Synthesis and evaluation of series of diazine-bridged dinuclear platinum(II) complexes through *in vitro* toxicity and molecular modeling: correlation between structure and activity of Pt(II) Complexes. *J. Med. Chem.* 58, 1442-1451.
- Savic N, Milivojevic D, Glisic B, Ilic-Tomic T, Veselinovic J, Pavic A, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J, Djuran M. (2016) A comparative antimicrobial and toxicological study of gold(III) and silver(I) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocycles: synergistic activity and improved selectivity index of Au(III)/Ag(I) complexes mixture. *RSC Adv.* 6, 13193-13206.

### Пројекти

- Изучавање структуре и функције гена индустријских микроорганизама, потпројекат Молекуларна генетика микромоноспора (Ев. бр. 03Е10, пројекат финансирало Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије, 1996–2000)
- Молекуларна генетика микроорганизама и експресија гена од економског значаја (Ев. бр. 1512, пројекат финансирало Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2002–2005)
- Regulation of gene expression in antibiotic producer *Streptomyces tenebrarius* (Ев. бр. CRP/YUG00-05, пројекат финансирао ICGEB, 2001–2003)
- Експресија и регулација фармацеутски значајних гена у микроорганизмима (Ев. бр. 143056, пројекат финансирало Министарство за науку и заштиту животне средине Републике Србије, 2006–2010).
- Structure-function studies of 16S rRNA methyltransferases: the basis of aminoglycoside antibiotic resistance and enzyme translational autoregulation (Ев. бр. 078374, пројекат финансирао Wellcome Trust, 2006–2008)
- Search for new bioactive secondary metabolites (билатерална сарадња Српске академије наука и уметности и Академије наука Чешке Републике, 2006–2010)
- Microbial diversity in the copper mine Bor (Ев. бр. CRP/YUG09-03, пројекат финансирао ICGEB, 2010–2012)
- Изучавање микробиолошког диверзитета и карактеризација корисних срединских микроорганизама (Ев. бр. ОН173048, пројекат финансирало Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2011–2015)
- Assessing and monitoring microbial communities and their impact on documentary heritage in collection of National Library of Serbia – Preserving the memory of the world (AMARCORD), (Ев. бр. 590-2/2012, пројекат финансирао UNESCO, 2013)
- Комбинаторне библиотеке хетерогених катализатора, природних производа, модификованих природних производа и њихових аналога: пут ка новим биолошки активним агенсима (Ев. бр. 172061, пројекат финансирао Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2011–2015)
- Functionalisation of bacterial polymers (Ев.бр. ВР2013, пројекат финансирао Bioplastech Ltd., Dublin, Ireland, 2013–)
- Structurally guided identification of novel pharmacophores targeting *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm formation (пројекат финансирао ESCMID Resarch Grant, 2015–2016)
- Development of biopolymeric formulation of antifungal polyenes using medium chain length polyhydroxyalkanoate (PHA): validation against superficial mycoses (пројекат финансирао ESCMID Resarch Grant, 2015–2016)

### Награде

- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи дипломски рад из области молекуларне биологије у Србији (Тања Наранчић, 2006; Сања Бајкић, 2007)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи магистарски рад из области молекуларне биологије у Србији (Лидија Шенеровић, 2005)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи мастер рад из области молекуларне биологије у Србији (Јелена Спасић, 2015)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље докторске дисертације из области молекуларне биологије у Србији (Татјана Илић-Томић, 2010; Сандра Војновић, 2011; Нада Станковић, 2012)
- Награда за најбољи пројекат (ESCMID/FEMS Research Fellowship): Лидија Шенеровић (2015)





Тридесетогодишњи научни рад Лабораторије за молекуларну микробиологију (ЛММ) у области молекуларне генетике индустријских микрорганиса усмерио је данашње активности ка фундаменталним и примењеним истраживањима на пољу биомедицине и биотехнологије. ЛММ поседује јединствену колекцију бактерија млечне киселине (БМК) која садржи сојеве изоловане из традиционалних ферментисаних млечних производа, али и микроорганизме хуманог порекла укључујући и клиничке изолате. Тренутна истраживања обухватају: а) идентификацију и карактеризацију БМК као произвођача антимикробних и биоактивних молекула; б) изучавање молекуларних механизма интеракција бактерија са домаћином; в) изолацију и карактеризацију бактерија хуманог и анималног порекла одговорних за здравствени статус људи и животиња, г) изучавање феномена настанка, одржавања и ширења резистенције бактерија на антибиотике као и д) изучавање фактора вируленције и молекуларних механизма у основи деловања патогена.

Вишегодишњи истраживачки рад ЛММ настављен је и кроз иновациону делатност у смислу дизајнирања нових функционалних стартер култура за примену у прехранбеној индустрији и пробиотичких култура за превенцију и третман различитих болести и стања људи и животиња.

Thirty years of research in Laboratory of Molecular Microbiology (LMM) in the field of molecular genetics of industrial microorganisms directed today's scientific activities towards fundamental and applied research in biomedicine and biotechnology. LMM owns a unique collection of lactic acid bacteria (LAB), encompassing strains isolated from traditional fermented dairy products and microorganisms of human origin, including clinical isolates. Current research includes: a) identification and characterization of LAB producers of antimicrobial and bioactive molecules; b) study of the molecular mechanisms of the host-microbe interactions; v) isolation and characterization of bacteria of human and animal origin responsible for the health status of humans and animals, g) the phenomenon of development, maintenance and spread of antibiotic resistance among bacteria d) the study of virulence factors and molecular mechanisms of pathogen activities.

LMM is engaged in innovation activities aimed towards new functional starter cultures for application in the food industry and probiotic cultures for the prevention and treatment of different diseases and conditions in humans and animals.



## Лабораторија за молекуларну микробиологију Laboratory for Molecular Microbiology



др Милан Којић  
научни саветник  
Milan Kojić, PhD  
Principal Research Fellow



проф. др Ђорђе Фира  
редовни професор  
Đorđe Fira, PhD  
Full Professor



др Милица Живковић  
научни сарадник  
Milica Živković, PhD  
Research Associate



Катарина Нововић  
истраживач-сарадник  
Katarina Novović, MSc  
Research Assistant



**Руководилац**  
др Јелена Беговић  
виши научни сарадник  
**Head**  
Jelena Begović, PhD  
Senior Research Associate



др Маја Толиначки  
научни сарадник  
Maja Tolinački, PhD  
Research Associate



др Јованка Лукић  
научни сарадник  
Jovanka Lukić, PhD  
Research Associate



Мирослав Динић  
истраживач-приправник  
Miroslav Dinić, MSc  
Research Trainee



др Наташа Голић  
научни саветник  
Natasa Golić, PhD  
Principal Research Fellow



проф. др Бранко Јовчић  
ванредни професор  
Branko Jovčić, PhD  
Associate Professor



др Сања Михајловић  
научни сарадник  
Sanja Mihajlović, PhD  
Research Associate



Светлана Соковић  
истраживач-приправник  
Svetlana Soković, MSc  
Research Trainee



др Ивана Страхинић  
научни саветник  
Ivana Strahinić, PhD  
Principal Research Fellow



проф. др Јелена Лозо  
ванредни професор  
Jelena Lozo, PhD  
Associate Professor



др Јелена Ђокић  
научни сарадник  
Jelena Djokić, PhD  
Research Associate



Никола Поповић  
истраживач-приправник  
Nikola Popović, MSc  
Research Trainee



др Амарела Терзић Видојевић  
научни саветник  
Amarela Terzić Vidojević, PhD  
Principal Research Fellow



др Катарина Вељовић  
научни сарадник  
Katarina Veljović, PhD  
Associate Professor



Марија Миљковић  
истраживач-сарадник  
Marija Miljković, MSc  
Research Assistant



Душанка Поповић  
истраживач-приправник  
Dušanka Popović, MSc  
Research Trainee



## Research focus

**Probiotics** are defined as "live microorganisms which when administered in adequate amounts confer positive effect on the host." Probiotics exert their positive effects through: (a) competition with pathogenic bacteria for nutrients and binding to the host receptors on intestinal epithelial cells (IEC); (B) inactivation of toxins and metabolites produced by pathogens, (c) production of antimicrobial substances that inhibit the growth of pathogenic microorganisms, (d) stimulation/modulation of the host's immune response, or (e) an anticancer activity.

So far, our research has disclosed within LMM collection a great diversity of bacteria with unique genetic, technological and probiotic potential. Detailed molecular characterization of bacteria involves manipulation of genes of interest that is provided in LMM through the construction of specific LAB **cloning and expression vectors**. In this way the genes responsible for the production of exopolysaccharides (EPS), aggregation, proteinases and genes responsible for synthesis and immunity to bacteriocins are identified, cloned and expressed. Sequencing of complete genomes or plasmids from selected bacteria further elucidates genotype-phenotype correlations.

Experts from LMM, cloned, sequenced and characterized for the first time in the world genes responsible for the aggregation of lactococci - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1 (AggL) and lactobacilli - *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 (AggLb). Also, we cloned and characterized two gene clusters responsible for the production of EPS-CG11 in *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. Also, genes from a large number of different bacteria responsible for the synthesis and immunity to the bacteriocin were cloned and sequenced. For the first time Zn-dependent membrane metalloproteinase was identified as a receptor for LsbB bacteriocin cloned from *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. Apart from cloned PrtR proteinase from lactobacilli, LMM monitors the presence, distribution and role of different proteinase in LAB.

Research interest of LMM refers to discovering underlying molecular mechanisms linking bacteria to the host's health. Probiotic properties largely depend on the presence of specific molecules on the bacterial surface. Some natural isolates of lactobacilli from LMM collection have the ability to reduce adhesion of pathogenic bacteria to host's IEC. *Lb. paraplantarum* BGCG11 (EPS CG11 producer) and extracted EPS CG11, reduce cytotoxic effects of *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. In addition, some isolates of lactobacilli exhibit anti-inflammatory and immunosuppressive activity, while other have mildly pro-inflammatory effect and promote the development of the immune system. In addition, some strains of LMM collection have ability to produce  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) - a major inhibitory neurotransmitter in the mammalian nervous system with numerous physiological functions.

Our latest research relates to determination of probiotics role in prevention and treatment of specific diseases. Strain *Lb. paraplantarum* BGCG11 exerts a therapeutic effect in the streptozotocin-induced type 1 diabetes in rats. Biochemical parameters, including diabetes and blood sugar levels are reduced in rats treated with BGCG11 strain, while the Langerhans' islets can be restored.

In animal model of Crohn's disease, strain *Lactobacillus fermentum* BGHI14 exerted immunostimulative effect and acted protectively during the acute stage of the disease. Strain *Lactobacillus salivarius* BGHO1, bacteriocin producer, shows broad antimicrobial spectrum of action against Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria, including bacteria that cause tooth decay. Our research also relates to identification of LAB and/or their products as factors involved autophagy process in different cell types. Significant number of lactobacilli from LMM collection have the potential to induce autophagy in different cell types.

LMM research is also directed towards characterization of the **gut microbiota** composition as an indicator of human and animal health. Gut microbiota plays an important role in health and is responsible for numerous processes in host such as protein synthesis, production of signal molecules, antimicrobial agents, anti-inflammatory factors, pain relieve substances, antioxidants, as well as immune maturation and modulation.

The composition of the microbiota may play an essential role in the onset of various pathological conditions. In order to determine the role of bacteria in prevention multiple sclerosis development, animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was tested. Analysis of the composition of the microbiota revealed the existence of a broader diversity of lactobacilli and the presence of bacteria of the genus *Turicibacter* sp. in rats in which induction of EAE was impossible compared to the rats that developed disease following immunization.

In addition, we analyzed the composition of the microbiota in patients with autism spectrum disorders (Autism Spectrum Disorder - ASD). The basic idea is to evaluate and compare the composition of the intestinal microbiota in ASD patients and healthy children in Serbia, with the aim to identify bacterial groups as potential markers for early detection of intestinal microbiota composition imbalance in our population. Also we aim to establish early diagnostic methods that indicate possible development of ASD and other autoimmune diseases and neurological diseases in children.

**Enterococci** as an important LAB group has recently been extensively studied due to their controversial status. Some enterococci are opportunistic pathogens, possess virulence factors, carry antibiotic resistance genes, produce biogenic amines that cause allergic reactions and have biofilm formation ability. Nevertheless, enterococci also exhibit positive traits, produce enterocines, aroma compounds, included in starter cultures for dairy products and exhibit probiotic potential. Safety status of selected enterococci from LMM collection is being



## Фокус истраживања

**Пробиотици** су живи микроорганизми који, када се примењују у одговарајућим количинама, позитивно делују на здравље домаћина. Позитивно деловање пробиотици испољавају путем: конкуренције са патогеним бактеријама за нутријенте и за везивање за рецепторе на интестиналним епителним ћелијама (ИЕЋ) домаћина; инактивације токсина и метаболита патогена; производње антимикробних супстанци које инхибирају раст патогених микроорганизама; стимулација/модулације имунског одговора.

Током претходног периода, истраживања су показала да у оквиру ЛММ колекције постоји велики диверзитет бактерија са јединственим генетичким, технолошким и пробиотичким потенцијалом. Детаљна молекуларна карактеризација бактерија подразумева успешну манипулацију генима од интереса што се у ЛММ реализује кроз конструкцију специфичних **вектора за клонирање и експресију** у БМК. Овако се идентификују, клонирају и експримирају гени одговорни за производњу ектополисахарида (ЕПС), агрегацију, протеиназе, као и гени одговорни за синтезу и имуност на бактериоцине. Секвенцирање комплетних генома или плаزمида из одабраних бактерија додатно доприноси расветљавању и утврђивању корелације генотип–фенотип.

У ЛММ су први пут у свету клонирани, секвенцирани и окарактерисани гени одговорни за агрегацију у лактококама – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1 (AggL) и у лактобацилима *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 (AggLb). Такође, клонирана су и окарактерисана, два генска кластера одговорна за производњу ектополисахарида (EPS-CG11) у соју *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. У лабораторији је клониран и секвенциран већи број гена из различитих бактерија одговорних за синтезу и имуност на бактериоцине. Први пут је идентификована и Zn–зависна мембранска металопептидаза, као рецептор за LsbB бактериоцин соја *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. Поред клониране PrtR протеиназе из лактобацила, у ЛММ се прати присуство, распрострањеност и улога различитих протеиназа у БМК.

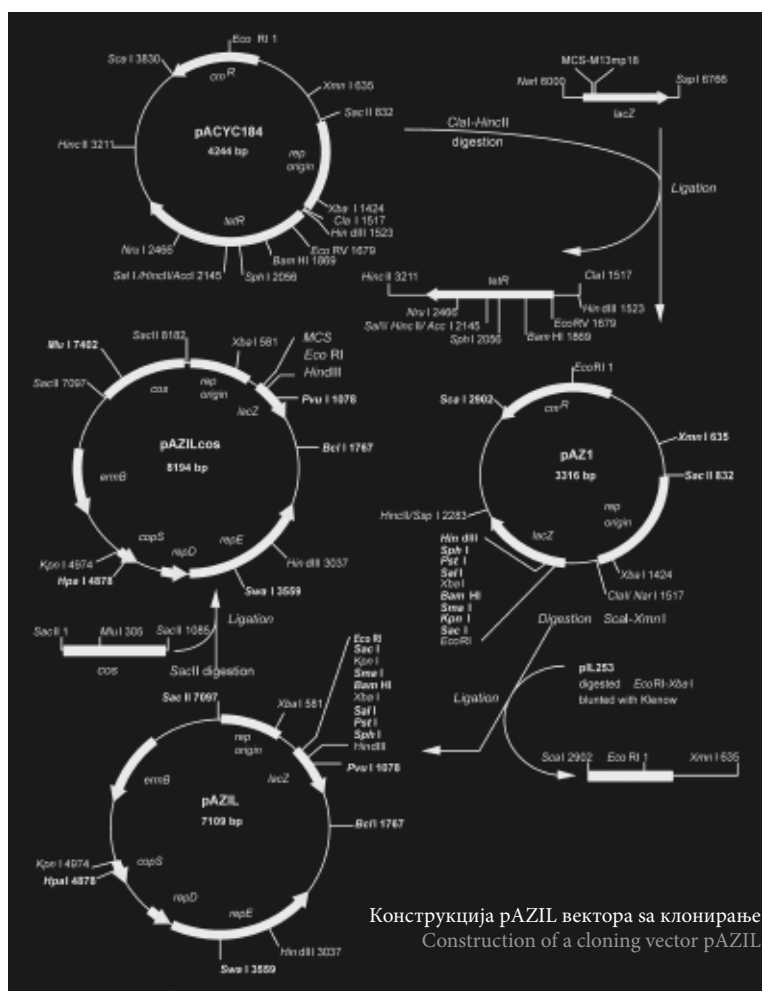
Део истраживања ЛММ усмерен је ка изучавању молекуларних механизма путем којих бактерије делују на здравље домаћина. Пробиотичка својства у великој мери зависе од присуства специфичних молекула на површини бактерија. Неки природни изолати лактобацила из ЛММ колекције имају способност смањења адхезије патогених бактерија за ИЕЋ домаћина. Сој *Lb. paraplantarum* BGCG11, продуцент EPS-CG11 ектополисахарида, као и сам EPS-CG11, смањују цитотоксични ефекат *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes*. Такође, поједини природни изолати лактобацила испољавају антиинфламаторно и имunosупресивно деловање, док неки имају благо проинфламаторно дејство и потпомажу развој имунског система. Додатно, поједини сојеви из ЛММ колекције имају способност продукције  $\gamma$ -аминобутерне киселине (GABA) која је главни инхибиторни неуротрансмисер у нервном систему сисара и има бројне физиолошке функције.

Најновија истраживања у ЛММ су везана за изучавање улоге пробиотика у превенцији и третману специфичних болести. Показано је да *Lb. paraplantarum* BGCG11 испољава терапеутски ефекат на стрептозотоцином индукован дијабетес типа 1 код пацова. Биохемијски параметри дијабетеса међу којима и ниво шећера у крви значајно су снижени код пацова третираних сојем BGCG11, док су Лангерхансова острвца у потпуности рестаурирана.

За сој *Lactobacillus fermentum* BGN14 утврђено је да у случају третмана животињског модела Кронове болести доводи до имуностимулативног ефекта и делује заштитно у акутном стадијуму болести. Са друге стране сој, *Lactobacillus salivarius* BGHO1, продуцент бактериоцина, показује широк антимикробни спектар деловања на Грам-позитивне и Грам-негативне патогене бактерије укључујући и узрочнике каријеса.

Посебно интересантно истраживање односи се на утврђивање улоге БМК и/или њихових продуката у индукцији процеса аутофагије у различитим типовима ћелија. Резултати показују да значајан број лактобацила из ЛММ колекције, активира процес аутофагије у различитим типовима ћелија.

Истраживања ЛММ усмерена су ка карактеризацији састава цревне микробиоте као показатеља здравственог стања људи и животиња. **Цревна микробиота** игра значајну улогу у очувању здравља и одговорна је за бројне процесе у организму домаћина као што су синтеза протеина, сигналних молекула, антимикробних супстанци, антиинфламаторних фактора, супстанци које умањују бол, антиоксиданаса и сазревање и модулацију имунског система. Састав микробиота може да има битну улогу у настанку



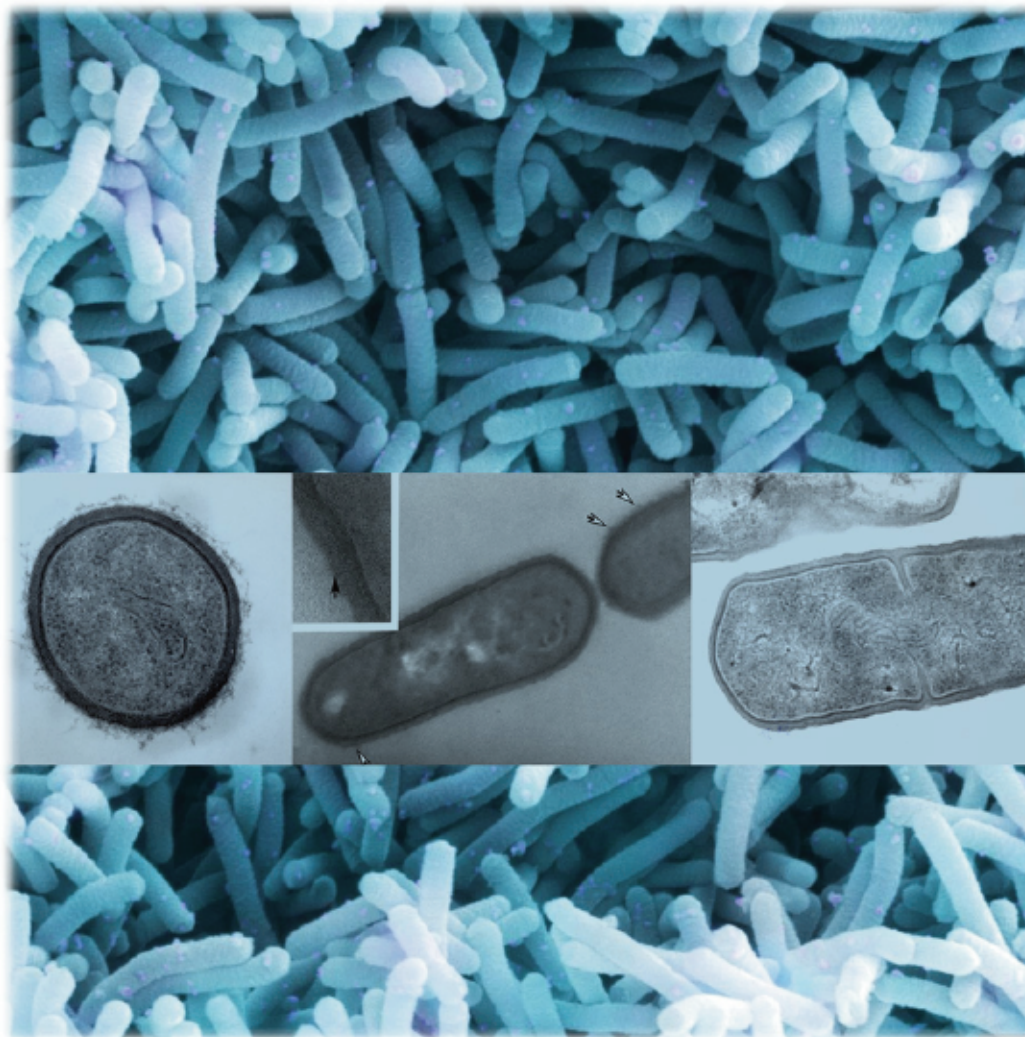
intensively studied, including research on molecular mechanisms of host-microbe interactions.

Antimicrobial agents dramatically lowered the death rate from infectious diseases and enabled the development of modern medicine. However, frequent excessive and incorrect use of antibiotics have caused the spread of **antibiotic resistance**, which is particularly worrying when it develops in bacteria causing disease in humans and animals. Resistance to antibiotics developed in one bacterium can be rapidly and unpredictably spread through the exchange of genetic material between bacteria. This is reason why the phenomenon of resistance to antibiotics has been recognized as one of the greatest challenges that humanity faces today.

Collaboration with leading clinicians from Serbia enables screenings for antibiotic resistance mainly in nonfermenting Gram-negative bacilli and *Enterobacteriaceae*. These bacterial species are considered today as leading causes of intrahospital and outpatient infections. The most important representatives are *Pseudomonas aeruginosa* strains, which are rapidly becoming multidrug-resistant including resistant to “last resort” antibiotics - carbapenems. Elucidation of molecular mechanisms of resistance to this class of antibiotics is one of the main goals of our laboratory. Taking into account the level and speed of carbapenem resistance dissemination among different bacterial species, metallo-beta-lactamases

are globally the most significant determinants of carbapenem resistance. The most prominent is New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1). Emergence of NDM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* was described for the first time by LMM team. Resistance to carbapenems was studied in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* species that entered the spotlight of global medical and scientific community as a causative agent of intrahospital epidemics. In addition to enzymatic degradation of carbapenems mediated by oxacillinases and metallo-beta-lactamases, mutations that alter or inactivate outer membrane porins, disabling carbapenem imipenem entrance to cell, significantly contribute to resistance to imipenem in *A. baumannii*. Our research resulted in the reclassification of CarO porins and description of new mutations in gene encoding CarO porin. Antibiotic resistance is also analyzed in bacterial species known to cause infections in patients with cystic fibrosis: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* complex.

The basic prerequisite for preventing the spread of antibiotic resistance is to characterize genetic systems that mobilize genetic determinants of resistance. One of the most important systems for the transfer of genetic determinants of resistance to antibiotics in clinically significant pathogenic bacteria is **class I integron**. The key enzyme involved in this process mediated by integron is site-specific recombinase - integrase. Integrase determines the structural dynamics of integron, catalyzes insertion of resistance determinants into integron and excises those determinants enabling its further spreading. Our research goal is to reveal the transcriptional regulation of integrase gene expression, since this is a critical step for the maintenance of determinants antibiotic resistance carried in integron. New therapeutic approaches in treatment of multiple resistant pathogens also include inhibition of their virulence factors, thus preventing the development of infection. That's the reason why our research is also devoted to studies of virulence factors present in clinical isolates from Serbia. Production of collagenase, elastase, biofilm formation and the presence of quorum sensing system are being analyzed. Also, we search for new inhibitory molecules that inactivate quorum sensing system or virulence factors of pathogens - thereby preventing infection establishment.



Електронска микрографија изолата произвођача егзополисахарида  
Transmission electron micrographs of exopolysaccharide producing strain





различитих патолошких стања. У циљу утврђивања улоге бактерија у превенцији развоја мултипле склерозе користи се животињски модел експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ). Анализа састава микробиота показује постојање веће разноврсности лактобацила и присуство бактерије рода *Turicibacter* sp. код пацова код којих није могуће изазвати ЕАЕ у односу на пацове који развијају болест након имунизације.

Поред тога, анализира се састав микробиота код пацијената оболелих од спектра аутистичних поремећаја (Autism Spectrum Disorder – АСД). Основна идеја је евалуација састава цревног микробиота код АСД пацијената и здраве деце у Србији и идентификација бактеријских група као потенцијалних маркера за рано откривање дисбаланса у саставу цревног микробиота у нашој популацији, као и успостављање ране дијагностичке методе која би правовремено указала на могућ развој АСД и других аутоимунских и неуролошких болести код деце.

**Ентерококе** представљају изузетно значајну групу БМК, која се у последње време интензивно изучава због контроверзног статуса. Ентерококе могу бити опортуне патогене бактерије, поседују вирулентне факторе, носе гене за резистенцију и имају способност формирања биофилма. Поједини сојеви ентерокока испољавају позитивна својства, производе ентероцине и аромогене компоненте те улазе у састав стартер култура за производњу млечних производа, а имају и пробиотички потенцијал. Одабране ентерококе из ЛММ колекције користе се за изучавање молекуларних механизма деловања бактерија на домаћина у циљу детаљније карактеризације њиховог безбедносног статуса.

Антимикробни агенси су од тренутка увођења у клиничку праксу драматично снизили стопу смртности од инфективних болести и омогућили развој савремене медицине. Честа прекомерна и погрешна употреба антибиотика условиле су ширење резистенције на антибиотике што је нарочито забрињавајуће када су у питању бактерије изазивачи болести човека и животиња. **Резистенција на антибиотике** која се развије у једној бактерији данас се брзо и непредвидиво шири посредством размене генетичког материјала између бактерија због чега је феномен резистенције на антибиотике препознат као један од највећих изазова са којима се човечанство данас суочава.

ЛММ, у сарадњи са водећим клиникама Србије, спроводи надзор над резистенцијом на антимикробне лекове углавном у Грам-негативним неферментујућим бацилима и ентеробактеријама. Бактеријске инфекције које припадају наведеним групама данас се сматрају водећим узрочницима унутарболничких и ванболничких инфекција. Најзначајнији представник ових бактерија је врста *Pseudomonas aeruginosa*, све чешће вишеструко резистентна на антибиотике, укључујући и антибиотике последње терапијске линије – карбапенеме. Управо су молекуларни механизми резистенције на карбапенеме један од главних истраживачких циљева. Са аспекта нивоа резистенције на карбапенеме и брзине ширења међу бактеријским врстама глобално су најинтригантније метало-бета-лактамазе, а међу њима и најзначајнија „New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)”. Истраживачки тим ЛММ је први у свету описао клиничке изолате врсте *Pseudomonas aeruginosa*, који продукују NDM-1. Резистенција на карбапенеме проучава се и код клиничких изолата врсте *Acinetobacter baumannii* која је доспела у жижу интересовања светске медицинске и научне јавности због све чешћих унутарболничких епидемија. Поред ензимске деградације карбапенема посредоване оксацилинским карбапенемазама и метало-бета-лактамазама значајан допринос укупној резистенцији на карбапенем имипенем сојевима *A. baumannii* обезбеђују и мутације у поринима спољашње мембране које последично онемогућавају улазак антибиотика у ћелију. Истраживања у ЛММ резултовала су рекласификацијом CarO порина као и описом нових мутација у гену за CarO порин. Резистенција на антибиотике анализира се и код бактеријских врста узрочника инфекција оболелих од цистичне фиброзе: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* комплекс.

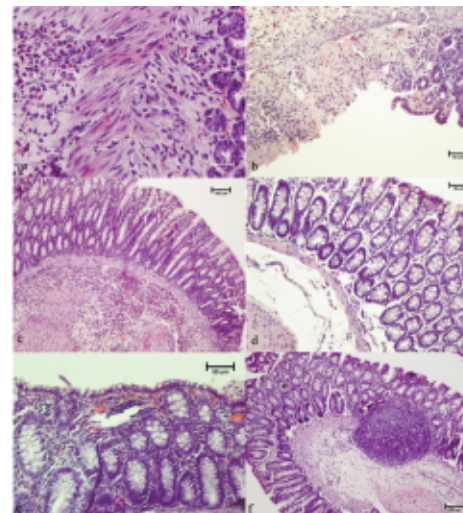
Основни предуслов за спречавање ширења резистенције на антибиотике јесте карактеризација генетичких система посредством којих долази до ширења унутар популација бактерија. Један од најзначајнијих система за пренос генетичких детерминанти резистенције на антибиотике међу клинички значајним патогеним бактеријама је **интегрон класе I**. Кључни ензим у ширењу резистенције на антибиотике посредоване интегронима је рекомбиназа специфична за место – интеграза. Интеграза одређује структурну динамику интегрона катализујући уградњу детерминанти резистенције на антибиотике у интегроне, као и њихову реакцију исецања из интегрона што им омогућава ширење. Предмет истраживања је и регулација транскрипције гена за интегразу. Нови терапијски приступи у третману патогена вишеструко резистентних на антибиотике подразумевају и инхибицију њихових фактора вируленције чиме се спречава развој инфекције. Зато је део ЛММ истраживања посвећен изучавању фактора вируленције који су присутни у клиничким изолатима из Србије. У оквиру ових истраживања анализира се производња колагеназа, еластаза, формирање биофилма као и присуство „quorum sensing” система међућелијске комуникације бактерија зависне од ћелијске густине. Такође, интензивно се трага за новим инхибиторним молекулима који би онеспособили „quorum sensing” систем или факторе вируленције патогена и самим тим онемогућили настанак инфекције.

Један од главних циљева науке данашњице је потрага за новим **антимикробним агенсима**, који делују против вишеструко резистентних бактерија. Експериментални приступ који се примењује у ЛММ подразумева анализу антимикробног потенцијала метагенома станишта која до сада нису анализирана, као и конструкцију функционалних метагеномских библиотека у циљу експресије и карактеризације потенцијалних нових антимикробних агенса. Такође се анализира инхибиторни потенцијал корисних бактерија кроз синтезу антимикробних супстанци (бактериоцина широког спектра и других антимикробних молекула), ексклузију патогена (синтеза агрегационих фактора) и смањивање његовог вирулентног ефекта (синтеза инхибитора „quorum sensing” система и фор-



One of the main challenges of science today is the development of new **antimicrobial agents** active against multi-resistant bacteria. One experimental approach applied in LMM includes analyses of antimicrobial potential of metagenomes in unexploited habitats and the construction of functional metagenomic libraries for the expression and characterization of potentially new antimicrobial agents. Also, the inhibitory potential of beneficial bacteria due to synthesis of antimicrobial compounds (bacteriocins and other broad-spectrum antimicrobial molecules), exclusion of pathogens and reduction of virulent effect (inhibitor "quorum sensing" system and biofilm formation) are being analyzed. LMM develops new vector systems for controlled expression and gene regulation in pathogens. Another experimental approach involves the possibility of using bacteriophages, specific chemical substances and products of medicinal plants in pathogen control.

Along with fundamental research LMM is directing activities towards application of the results in the food and pharmaceutical industries. Decades of research aimed at preservation of LAB biodiversity resulted in the construction of indigenous starter cultures for the production of various fermented dairy products as functional foods. Also, as a result of innovative activities LMM has developed the first domestic probiotic culture for the prevention of intestinal infections in humans and animals. Future applied research will be aimed towards the development of specific probiotics and new bioactive compounds to be used in therapies for different diseases and conditions in humans and animals.



Пресек ткива колона пацова са колитисом, храњеног бактеријама  
Cross-section of colonic tissue of bacteria-treated colitic rats

#### Selected publications

- Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, Kojic M. (2011) Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3929-3933.
- Jovcic B, Lepsanovic Z, Begovic J, Rakonjac B, Perovanovic J, Topisirovic L, Kojic M. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the blaNDM-1 gene in a novel genetic context. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, (7) 3405-7.
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., Begovic, J. (2013) Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa – implications for colitis induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(18), 5735-44.
- Ovchinnikov KV, Kristiansen PE, Uzelac G, Topisirovic L, Kojic M, Nissen-Meyer J, Nes IF, Diep DB. (2014) Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB. *J. Biol. Chem.* 289(34), 23838-45.
- Zivkovic M, Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinački, M., Golic, N., Kojic, M. (2015) Exopolysaccharide production and rpy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1387-96.
- Terzić-Vidojević A, Veljović K, Begović J, Filipić B, Popović D, Tolinački M, Miljković M, Kojić M, Golic N. (2015) Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures? *Front. Microbiol.* 6, 954.
- Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovcic B. (2015) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: revision of CarO classification. *PLOS One* 10(3), e0122793. doi: 10.1371/journal.pone.0122793.
- Rajilić-Stojanović M, Jonkers DM, Salonen A, Hanevik K, Raes J, Jalanka J, de Vos WM, Manichanh C, Golic N, Enck P, Philippou E, Iraqi FA, Clarke G, Spiller RC, Penders J. (2015) Intestinal microbiota and diet in IBS: causes, consequences or epiphenomena. *Am. J. Gastroenterol.* 110(2), 278-87.
- Miljkovic M, Strahinic I, Tolinački M, Nikolic M, Kojic S, Golic N, Kojic M. (2015) AggLb is the largest cell-aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64, functions in collagen adhesion, and pathogen exclusion in vitro. *PLOS One* 10(5), e0126387. doi: 10.1371/journal.pone.0126387
- Živković M, Miljković M, Ruas-Madiedo P, Markelić M, Veljović K, Tolinački M, Soković S, Korać A, Golić N. (2016) EPS-SJ exopolysaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2016.00286.

#### 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)
- 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).



мирања биофилма). У ЛММ се развијају и нови векторски системи за контролисану експресију и регулацију гена у циљу што бољег изучавања и контроле патогена и њихових механизма вируленције. Други експериментални приступ подразумева анализу могућности употребе бактериофага, специфичних хемијских супстанци и продуката лековитих биљака у контроли патогена.

У ЛММ се поред фундаменталних истраживања раде и истраживања која своју примену налазе у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Дугогодишња истраживања усмерена ка очувању биодиверзитета БМК данас налазе примену у конструисању аутохтоних стартер култура за производњу различитих ферментисаних млечних производа као функционалне хране. Такође, као резултат иновационе делатности у ЛММ је развијена прва домаћа пробиотичка култура за превенцију интестиналних инфекција људи и животиња. Будућа примењена истраживања биће усмерена и ка развоју специфичних пробиотика и нових биоактивних компоненти који ће се користити у терапијама различитих болести и стања људи и животиња.

#### Одабране публикације

- Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, Kojic M. (2011) Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3929-3933.
- Jovcic B, Lepsanovic Z, Begovic J, Rakonjac B, Perovanovic J, Topisirovic L, Kojic M. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene in a novel genetic context. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, (7) 3405-7.
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., Begovic, J. (2013) Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa – implications for colitis induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(18), 5735-44.
- Ovchinnikov KV, Kristiansen PE, Uzelac G, Topisirovic L, Kojic M, Nissen-Meyer J, Nes IF, Diep DB. (2014) Defining the structure and receptor binding domain of the leaderless bacteriocin LsbB. *J. Biol. Chem.* 289(34), 23838-45.
- Zivkovic M, Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N., Kojic, M. (2015) Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGC11. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1387-96.
- Terzić-Vidojević A, Veljović K, Begović J, Filipić B, Popović D, Tolinački M, Miljković M, Kojić M, Golic N. (2015) Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures? *Front. Microbiol.* 6, 954.
- Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovcic B. (2015) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: revision of CarO classification. *PLOS One* 10(3), e0122793. doi: 10.1371/journal.pone.0122793.
- Rajilić-Stojanović M, Jonkers DM, Salonen A, Hanevik K, Raes J, Jalanka J, de Vos WM, Manichanh C, Golic N, Enck P, Philippou E, Iraqi FA, Clarke G, Spiller RC, Penders J. (2015) Intestinal microbiota and diet in IBS: causes, consequences or epiphenomena. *Am. J. Gastroenterol.* 110(2), 278-87.
- Miljkovic M, Strahinic I, Tolinacki M, Nikolic M, Kojic S, Golic N, Kojic M. (2015) AggLb is the largest cell-aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64, functions in collagen adhesion, and pathogen exclusion *in vitro*. *PLOS One* 10(5), e0126387. doi: 10.1371/journal.pone.0126387
- Živković M, Miljković M, Ruas-Madiedo P, Markelić M, Veljović K, Tolinački M, Soković S, Korać A, Golić N. (2016) EPS-SJ exopolisaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2016.00286.

#### Пројекти

- Рекомбинатна ДНК у истраживању односа ген-протеин (пројекат основних истраживања). Потпројекат: Изучавање 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. UNIDO, 1988–1990.
- Примена генетичког инжењерства у добијању стартер култура бактерија млечне киселине (пројекат САНУ). Одбор за биомасу, САНУ, 1991–1995
- Развој технолошких поступака за добијање ферментисаних киселомлечних 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.
- Изучавање структуре и функције гена индустријских микроорганизама (пројекат основних истраживања, бр. 03Е10). Министарство за науку и технологију Републике Србије, 1996–2000
- Изолација 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
- Карактеризација плаزمида из аутохтоних лактобацила у конструкцији вектора. Савезно министарство за развој, науку и заштиту животне средине у оквиру 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. (CRP/YUG03-01), ICGEB, Италија, 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 питака (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 ки-



- Characterisation of plasmids from natural isolates of lactobacilli useful for vector construction (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 (funded by Serbian-France Bilateral Scientific Collaboration “Pavle Savic”, 2006–2007)
- Proteolytic activity analysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains (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)
- 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)
- Selection of *Lactobacillus nodensis* strain (CSK 964) derivative(s) lacking *vanB* gene, a genetic determinant conferring vancomycin resistance of the strain. CSK Food Enrichment BV, Leeuwarden, The Netherlands, 2011–2012
- The improvement of different industrial lactic acid bacteria. CSK Food Enrichment BV, Leeuwarden, The Netherlands, 2012–2013
- 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)
- Propionibacterium diversity in artisanal Balkan dairy products (CSK Food Enrichment BV, Leeuwarden, The Netherlands, 2013–2014)
- Lactic acid bacteria bioactive compounds as inducers of autophagy ((ICGEB, Italy, 2013-2016 CRP/YUG13-02)
- Biodiversity and mutagenesis studies in LAB (CSK Food Enrichment BV, Leeuwarden, The Netherlands, 2014–2015)
- The Genes in Irritable Bowel Syndrome Research Network Europe (GENIEUR). COST, 2012-2016.
- Development of new dairy cultures for semi-hard and swiss applications (CSK Food Enrichment BV, Leeuwarden, The Netherlands, 2016–2017)
- Survey for antimicrobials effective against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. (ICGEB, Italy, 2016–2018, CRP/CPB15-02)

#### Awards

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



- селине (технолошки пројекат евиденциони број: 45-01-02960/2006-82). Министарство за науку и заштиту животне средине Републике Србије, 2007–2008
- Molecular characterisation of LAB isolated from autochthonous white cheeses with geographical origin. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 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. Међувладин програм научно-технолошке сарадње Србије и Француске „Павле Савић”, 2006–2007
  - Proteolytic activity analysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2007
  - Characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditionally produced cheeses in Serbia and Montenegro. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2007–2008
  - Use of lactic acid bacteria in production of hypoallergenic dairy products, and for the generation of mild antimicrobials. SEE-ERA.NET бр. Нр 06-1000031-10522, 2007–2008
  - Molecular characterisation of bacteriocin producing strains (CRP/YUG06-01), ICGEB, Италија, 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 применом 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. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2009–2010
  - Conservation and standardisation of traditional technologies of fermented milk products based on autochthonous lactic acid bacteria. SEE-ERA.NET (ERA 195), 2010–2012
  - Изучавање протеолитичке активности бактерија млечне киселине. Међувладин програм Научно-технолошке сарадње између Србије и Француске „Павле Савић”, 2010–2011
  - The improvement of different industrial lactic acid bacteria. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2000–2012
  - Characterisation of spectinomycin induced chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50 (CRP/YUG10-01), ICGEB, Италија, 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, 2011–2016
  - *In vitro* и *ex vivo* интеракција пробиотичких сојева, произвођача егзополисахарида, са интестиналним епителијалним ћелијама (GUT-EPS). Међувладин програм Научно-технолошке сарадње између Србије и Краљевине Шпаније, 2011–2012
  - Selection of *Lactobacillus nodensis* strain (CSK 964) derivative(s) lacking *vanB* gene, a genetic determinant conferring vancomycin resistance of the strain. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2011–2012
  - The improvement of different industrial lactic acid bacteria. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2012–2013
  - Diversity and distribution of plasmids of lactic acid bacteria. Међувладин програм Научно-технолошке сарадње између Србије и Краљевине Шпаније, 2012–2013
  - Propionibacterium diversity in artisanal balkan dairy products. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2013–2014
  - Молекуларна карактеризација бактерија из родова *Bacillus* и *Pseudomonas* као потенцијалних агенса за биолошку контролу. (основна истраживања, бр. 173026). Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, 2011–2014
  - Biodiversity and mutagenesis studies in LAB. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2014–2015
  - 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, 2011–2016
  - Lactic acid bacteria bioactive compounds as inducers of autophagy (CRP/YUG13-02), ICGEB, Италија, 2013-2016
  - The Genes in Irritable Bowel Syndrome Research Network Europe (GENIEUR). COST, 2012-2016
  - Development of new dairy cultures for semi-hard and swiss applications. CSK Food Enrichment BV, Холандија, 2016–2017
  - Survey for antimicrobials effective against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CRP/SRB15-02). ICGEB, Италија, 2016–2018

#### Награде

- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи магистарски рад из области молекуларне биологије у Србији (Бранко Јовчић, 2006; Маја Толинчички, 2007)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље докторске дисертације из области молекуларне биологије у Србији (Јелена Лозо, 2009; Бранко Јовчић, 2010)
- Награда за најбољи магистарски рад коју додељује Српско биолошко друштво: Милица Николић (2007)





У претходном периоду истраживачки фокус лабораторије је био анализа структуре и регулације експресије одабраних гена хељде и функције протеина кодираних овим генима у различитим физиолошким процесима и условима стреса. Гени/протеини од интереса су резервни протеини семена, аспартичне протеиназе, металотионеини и гени/протеини који учествују у процесима аутоинкомпатибилности. Актуелна истраживања су усмерена на молекуларне механизме који леже у основи одговора биљака на различите типове абиотичког стреса (нутритивни стрес, токсични метали, суша и др.) на транскрипционом и посттранскрипционом нивоу. Једна од истраживачких тема у лабораторији су истраживања која се баве изоловањем и карактеризацијом биоактивних једињења из биљака, тестирањем њихове биорасположивости и ефеката на хумане ћелије и модел организме. Новина у активностима лабораторије је проучавање хомологне рекомбинације и њене улоге у биотичком стресу на моделу *Ustilago maydis*. У оквиру ових истраживања проучавају се и гени који су истовремено укључени у процесе уклањања оксидованих протеина, а добијени резултати се могу транслирати на примењене области биомедицине.

During previous period Laboratory's research has been focused on the analysis of the structure and regulation of expression of selected buckwheat genes as well as on functions of proteins coded by the genes involved in different physiological processes and under various stress conditions. Genes/proteins of interest included seeds' storage proteins, aspartic proteases, metallothioneins and those associated with self-incompatibility. Current research is directed towards understanding of molecular mechanisms underlying plant response to different abiotic stresses (nutritive stress, toxic metals, drought, etc.) at transcriptional and posttranscriptional level. Another important research topic involves isolation and characterization of plants' bioactive compounds, testing their bioavailability and effect on human cells and other model systems. The complete novelty in the Laboratory's activities is research on the homologous recombination and its role in biotic stress in the model *Ustilago maydis*. Within this research we also study genes simultaneously involved in the removal of oxidized proteins, therefore offering possibility of translation of the obtained results to applied biomedicine.

## Лабораторија за молекуларну биологију биљака Laboratory for Plant Molecular Biology



**Руководилац**  
др Јелена Самарџић  
научни сарадник  
**Head**  
Jelena Samardžić, PhD  
Research Associate



проф. др Светлана Радовић  
редовни професор  
Svetlana Radović, PhD  
Full Professor



др Весна Максимовић  
научни саветник  
Vesna Maksimović, PhD  
Principal Research Fellow



др Јованка Миљуш Ђукић  
научни саветник  
Jovanka Miljuš Đukić, PhD  
Principal Research Fellow



др Милорад Којић  
научни саветник  
Milorad Kojić, PhD  
Principal Research Fellow



др Гордана Тимотијевић  
научни сарадник  
Gordana Timotijević, PhD  
Research Associate



др Мира Милисављевић  
научни сарадник  
Mira Milisavljević, PhD  
Research Associate



др Драгана Николић  
научни сарадник  
Dragana Nikolić, PhD  
Research Associate



др Бојана Бановић  
научни сарадник  
Bojana Banović, PhD  
Research Associate



др Живко Јовановић  
научни сарадник  
Živko Jovanović, PhD  
Research Associate



др Јелена Алексић  
виши научни сарадник  
Jelena Aleksić, PhD  
Senior Research Associate



др Немања Станисављевић  
истраживач сарадник  
Nemanja Stanisljević, PhD  
Research Assistant



Драгана Боснић  
истраживач-сарадник  
Dragana Bosnić, Msc  
Research Assistant



Јелена Петковић  
истраживач-приправник  
Jelena Petković, Msc  
Research Trainee

## Research focus

During the past period the main research interest was dedicated to studying abiotic stress factors, especially those of great importance for agriculture, such are drought, nutritional stress, stress induced by toxic metals and high salinity. Drought stress was studied in pea (family *Fabaceae*) and *Medicago truncatula*, as model plants. Since drought is a multiplex stress factor that activates a complex network of differentially expressed genes/signaling pathways, we have chosen to investigate the expression of the transcriptional factor DREB2 in pea during dehydration with the aim to find a common factor of the entire regulation. The results have revealed that in the response to drought the DREB2 gene expression was predominantly induced in root. Further, we tested the expression of small RNAs – miRNA398 and miRNA408 along with the expression of potential target genes. The results disclosed that *SOD* gene is of special importance. The expression of the relevant genes was also investigated in different tissues of cucumber grown in optimal physiological conditions vs. nutritive stress conditions induced by iron deficit/copper excess. Since copper excess leads to oxidative stress, we have also examined the expression of enzymes involved in the oxidative response. Special attention was given to the analysis of the molecular basis of silicon's beneficial effect through stimulation of antioxidative response.

One of plant stress responses involves production of various organic compounds, some of which have bioactive properties. The most abundant representatives of bioactive compounds in plants are phenols. So, one of the research topics was focused on isolation and detailed characterization of plants' bioactive phenol compounds as well as testing their bioavailability and the effect on human cells and other model organisms.

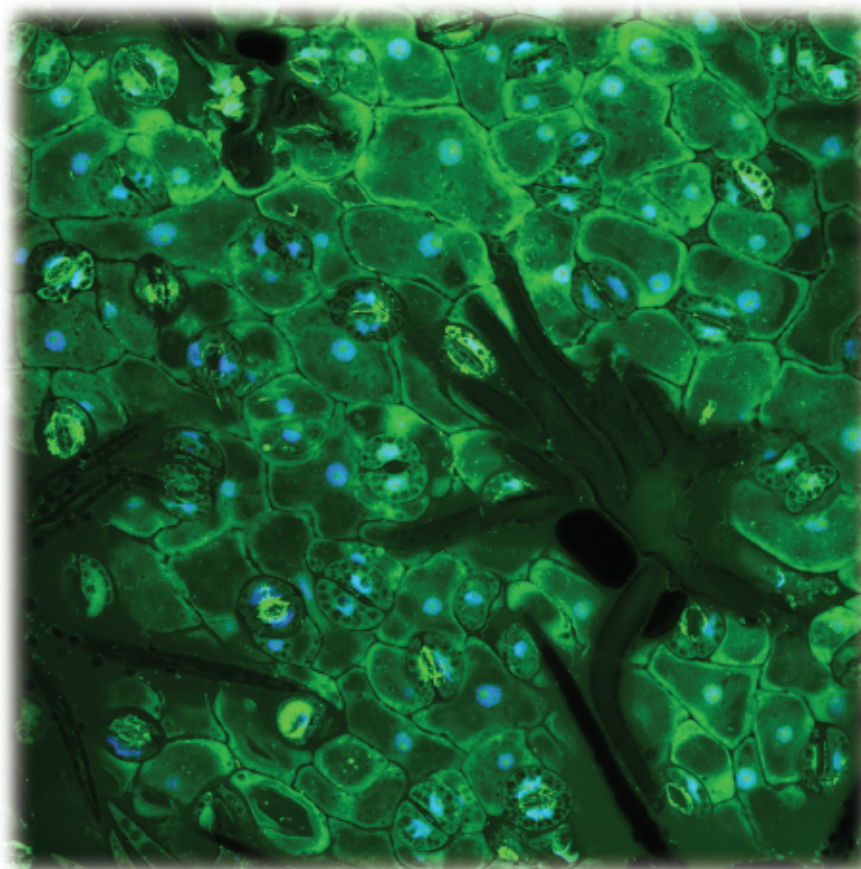
The analysis of genetic diversity of wild species and local landraces of agriculturally important species is a necessary step toward the potential biotechnological enhancement of cultivated species' resistance to abiotic stresses. Therefore, the research in the field of microevolution (population genetics), phylogeography and macroevolution (phylogenetics) of agriculturally important plants is one of the activities in our Laboratory.

During this project period we also introduced a novel model system *Ustilago maydis*, a maize parasitic fungus. The main interest of the research on *U. maydis* involves studying molecular mechanisms responsible for the maintenance of the integrity of cellular macromolecules, primarily DNA and proteins, under oxidative stress. We studied the correlation between DNA repair deficient mutants of *U. maydis*, and pathogenic stadium that a particular mutant may reach during the corn plant infection as well as the defense substances production upon biotic stress. One of these mutants is *dss1* lacking Dss1 protein, which cannot complete life cycle in maize. Moreover, Dss1 is known to be involved in the process of recognition of oxidized proteins and their degradation in proteasomes – phenomenon known as DSSylation.

During the past 15 years, buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) was the model-plant studied in LMBP. Genes/proteins of specific interest were seed storage proteins, aspartic proteinases, metallothioneins as well as those involved in the self-incompatibility phenomena. Analysis of gene expression regulation of specific buckwheat genes contributed to our understand of common molecular mechanisms in plant cells. This was a basis for elucidation of possible functions of these proteins in different physiological processes and under stress conditions in buckwheat.

Our first model-gene/protein(s) were seed storage proteins (SSPs). SSPs are characterized by a tissue specific (exclusively synthesized in seeds) and temporary regulated (specific phases of seed development) gene expression and therefore are a good candidat model for studying mechanisms of gene switching during the late embryogenesis in specific tissues. They are also usefull in molecular evolutionary studies. Due to nutritive value of SSPs and their specific amino acids content they have potential for biotechnological application. The genomic clone *gFeLEG51*, was amplified as a first published gene from buckwheat (belonging to 13S legumin-like).

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.



Комфокална микроскопија на листовима *Alyssum markgrafii*, бојење са DAPI and DCF  
Confocal Microscopy of *Alyssum markgrafii* leaves, staining with DAPI and DCF New Port Green





## Фокус истраживања

У протеклих пет година фокус Лабораторије за молекуларну биологију биљака (ЛМББ) био је на факторима абиотичког стреса посебно битним за пољопривреду – суша, нутритивни стрес, токсични метали, салинитет. Суша је посебно анализирана на грашку (фам. *Fabaceae*) и на *Medicago truncatula* – одговарајућој модел-биљци. Како је суша комплексан стрес који укључује мрежу различито експримираних гена и сигналних путева, у циљу проналажења заједничког фактора читавог регулона, изабран је транскрипциони фактор DREB2 грашка током дехидратације и показано је да је експресија овог гена посебно индукована у корену. Осим овога испитивана је експресија малих РНК-миРНК398 и миРНК408, као и експресија потенцијалних таргет гена. Показано је да је од посебне важности ген за SOD. Осим грашка, одговарајућа експресија је праћена током развића различитих органа краставца гајеног у физиолошким условима у поређењу са условима стреса изазваног дисбалансом микроелемената као што је недостатак гвожђа или вишак бакра. Како вишак бакра првенствено доводи до оксидативног стреса, праћена је експресија ензима укључених у одговор на ову врсту стреса. Посебна пажња посвећена је анализи молекуларних основа корисног ефекта силицијума у превазилажењу стреса изазваног вишком, односно недостатком микроелемената.

У условима стреса један од одговора биљака је и продукција различитих органских једињења од којих многа имају биоактивно дејство. Једна од најбројнијих група ових једињења су феноли. Једна од истраживачких тема у лабораторији су истраживања која се баве изоловањем и карактеризацијом биоактивних фенолних једињења из биљака, као и тестирањем њихове биорасположивости и ефеката на хумане ћелије и модел организме.

Истраживања генетичког диверзитета дивљих врста, као и локалних популација агрономски значајних врста, представљају неопходан корак ка биотехнолошком унапређивању гајених врста у смеру повећања отпорности на абиотички стрес, тако да су

истраживања на пољу микроеволуције (популационе генетике), филогеографије и макроеволуције (филогенетике) биљака значајних за пољопривреду заступљена у нашим истраживањима.

У истраживања ЛМББ уведен је и нови модел систем *Ustilago maydis*, гљива која паразитира на кукурузу. Главна тема истраживања на *U. maydis* јесу молекуларни механизми одговорни за очување интегритета макромолекула, пре свега ДНК и протеина, под дејством оксидативног стреса (ОС). Изучавана је корелација између репаративних мутаната *U. maydis*, стадијума патогенезе који одређени мутанти могу да постигну и продукције одбрамбених супстанци након биотичког стреса. Један од мутаната је и *dss1* мутант коме недостаје *Dss1* протеин, и који не може да заврши ћелијски циклус у кукурузу. Поред тога, за *Dss1* је показано да је укључен у препознавање оксидованих протеина и њихову деградацију у протеозомима – феномен познат као ДСС-илација.

Протеклих 15 година део истраживања у лабораторији био је фокусиран и на испитивање структуре и функције одабраних гена хељде (*Fagopyrum esculentum* Moench). Анализа структуре и регулације експресије ових гена хељде допринела је разумевању општих механизма регулације у биљним ћелијама, као и 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 у почетку је потекло од интересовања за резервне протеине семена (РПС) ове биљке из неколико разлога: то је изузетан



*Ustilago maydis*, паразит на кукурузу  
*Ustilago maydis*, a maize parasitic fungus

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. Поред поређења података са РПС других биљака и употребе ових гена као молекулских маркера при молекуларно-еволуционим анализама, оно што издваја РПС хељде и што омогућава каналисање истраживања са фундаменталних ка примењеним, јесте изузетна нутритивна вредност протеина, што отвара могућност биотехнолошке примене у пољопривреди, преносом гена који кодирају ове протеине у друге биљке методама генетичке трансформације.

При анализи протеинског профила семена, у вези са 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) -ензима који имају спосособност процесирања и деградације протеина, а о егзактним функцијама закључује се само посредно, углавном на основу локализације, супстратне специфичности и на основу утицаја различитих физиолошких фактора и фак-



It was demonstrated that AP 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 AP expression dramatically increases during leaf senescence. Importantly, the expression is up regulated by exposure of plants to drought, darkness, wounding and pathogen attack, indicating its role in stress responses. Another cDNA clone coding for an atypical plant AP lacking the plant specific insert, so called aspartic-like protease (APL), was also isolated from the same cDNA library. Analysis of APL gene expression under various stress factors as well as seed-specific expression was confirmed by RT-PCR, Real Time PCR and Western blot analyses.



Утицај силицијума на ублажавање токсичних ефеката бакра на биљке краставца  
Ameliorative effect of silicon on cucumber plants under copper stress

Plant metallothioneins (MTs) have a great impact on maintenance of metal homeostasis as well as in balancing the redox status of the plant cells. Research on plant MTs lags by almost 25 years behind that performed in animals, but the functions of MTs are still a subject of controversy. An MT cDNA clone was isolated from the cDNA library of developing buckwheat seed. Subsequently, the corresponding genomic clone, comprising the 5' regulatory region, was identified.

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*.

Since the abiotic and biotic stress response is one of the phenomena which could connect all the investigated genes/proteins, our research focus continues towards 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 the antioxidative enzyme activity (superoxide dismutase, catalase, peroxidases and glutathione reductase) were investigated. The changes in the expression of heat shock proteins and dehydrins were immunochemically 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.

The other research interest of LMBP includes studies of the molecular mechanisms of self-incompatibility (SI). Thus, 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. We have studied heteromorphic sporophytic SI in buckwheat, a species that 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

- 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.
- Milislavljević 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.
- 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, Milislavljević 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.



тора стреса на генску експресију. Запажено је повећање експресије гена за аспартичну протеиназу при излагању листа хељде факторима абиотичког стреса (суша, мраком изазвана сенесценција и повећана концентрација кадмијума), као и у условима симулације напада патогена. Из исте библиотеке cDNA изолована је и cDNA која кодира атипичну АП која не саржи домен PSI (карактеристика типичних АП биљака), а затим и одговарајући геномски клон чијом је анализом показано да не садржи интроне. 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.

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 хељде у средњој фази сазревања изолован и клон за металотионеин типа 3 (MT3), отворена је могућност за анализу. Идентификован је и геномски клон, који је, поред кодирајуће секвенце, обухватао и део 5'-регулаторног региона. 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  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cd}^{2+}$ .

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 debneyi*.



Европски генотипови грашка (*Pisum sativum*) са различито обојеним семењачама  
European genotypes of pea (*Pisum sativum*) with differently coloured seed coats

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 одговарајућих 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 периодом односи се на проучавање молекуларне основе феномена аутоинкомпатибилности на два система - дивљим популацијама рода *Prunus* за који је карактеристичан гаметофитни систем ( 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 одређене алеле и њихови „партнери” из полена - SFB алелске варијанте. У овом периоду започет је и рад на анализи механизма хетероморфне аутоинкомпатибилности 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.

#### Одабране публикације

- 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.
- Milislavljević 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.
- Bračić 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, Milislavljević 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 Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> Treatments. *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.
- Pavlovic J., Samardzic J., Masimović V., Timotijevic G., Stevic N., Laursen K.H., Hansen T.H., Husted S., Schjoerring J.K., Liang Y., Nikolic M. (2013). Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytologist* 198: 1096-1107
- Ljiljana Kostic, Nina Nikolic, Jelena Samardzic, Mira Milisavljevic, Vuk Maksimović, Dragan Cakmak, Dragan Manojlovic, Miroslav Nikolic Liming of anthropogenically acidified soil promotes phosphorus acquisition in the rhizosphere of wheat *Biology and Fertility of Soils* vol. 51 br. 3, str. 289-298
- Stanisavljević N., Samardžić J., Janković T., Šavikin K., Mojsin. M., Topalović V., Stevanović M Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix *Food Chemistry*, 2015; 175, 516-522
- de Sena-Tomas Carmen, Sutherland Jeanette H. Milisavljevic Mira Dj., Nikolic Dragana B., Perez-Martin Jose, Kojic Milorad O., Holloman William K. (2015) LAMMER kinase contributes to genome stability in *Ustilago maydis*, *DNA REPAIR*, vol. 33 br. , str. 70-77

### 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)
- CRP/YUG14-01 "Dss1's roles in genome integrity and protein oxidative damage control", ICGEB Italy
- Serbia-Slovakia Bilateral Project 2015–2016. "Effect of Silicon on Toxicity of Heavy Metals and Hazardous Trace Elements in Crop Plants" Comenius University in Bratislava
- Research Night "SCIMFONICOM 2014–15"- EU, H2020-MSCA-NIGHT-2014-633376
- Innovative project MNTRS 2014– 2015. "Detection and quantification of animal DNA in food and feed products", No 451-03-2802- 1/161
- Serbien-French Technology Co-Operation For Years 2012–2013, funded by MNTRS "Characterisation of faba bean genetic resources (*Vicia faba* L) to support genetic improvement of this agronomic legume(FABAGRALE)
- Serbia- Portugal bilateral project 2011–2012, funded by MNTRS "Integrating transcriptional and posttranscriptional expression regulation in *Pisum* species subjected to water deficit"
- 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

- Award of "Goran Ljubijankić" Foundation for best BSc thesis in the field of molecular biology in Serbia (Bojana Banović, 2005; Živko Jovanović, 2007; Nemanja Stanisavljević, 2010)
- Award of "Goran Ljubijankić" Foundation for best PhD thesis in the field of molecular biology in Serbia (Gordana Timotijević, 2009; Dragana Nikolić, 2010)



- 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 Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> Treatments. *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.
- Pavlovic J., Samardzic J., Masimović V., Timotijevic G., Stevic N., Laursen K.H., Hansen T.H., Husted S., Schjoerring J.K., Liang Y., Nikolic M. (2013). Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytologist* 198: 1096-1107
- Ljiljana Kostic, Nina Nikolic, Jelena Samardzic, Mira Milisavljevic, Vuk Maksimović, Dragan Cakmak, Dragan Manojlovic, Miroslav Nikolic Liming of anthropogenically acidified soil promotes phosphorus acquisition in the rhizosphere of wheat *Biology and Fertility of Soils* vol. 51 br. 3, str. 289-298
- Stanisavljević N., Samardžić J., Janković T., Šavikin K., Mojsin. M., Topalović V., Stevanović M Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix *Food Chemistry*, 2015; 175, 516-522
- de Sena-Tomas Carmen, Sutherland Jeanette H. Milisavljevic Mira Dj., Nikolic Dragana B., Perez-Martin Jose, Kojic Milorad O., Holloman William K. (2015) LAMMER kinase contributes to genome stability in *Ustilago maydis*, *DNA REPAIR*, vol. 33 br. , str. 70-77

### 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
- CRP/YUG14-01 „Dss1’s roles in genome integrity and protein oxidative damage control”, ICGEB Italy
- Програм научне и технолошке сарадње између Републике Србије и Републике Словачке за период 2015–2016. „Effect of Silicon on Toxicity of Heavy Metals and Hazardous Trace Elements in Crop Plants“  
Comenius University in Bratislava
- Ноћ истраживача "SCIMFONICOM 2014–15" - EU, H2020-MSCA-NIGHT-2014-633376
- Иновациони пројекат МНТРС 2014-јул 2015. „Детекција и квантификација ДНК анималног порекла у храни и храни за животиње”, број 451-03-2802-тип 1/161
- Програм научне и технолошке сарадње између Републике Србије и Републике Француске за период 2012–2013. “Карактеризација генетичких ресурса боба (*Vicia faba* L.) у циљу повећања генетичке основе за оплемењивање ове ратарски значајне легуминозе” (FA-BAGRALE)
- Програм научне и технолошке сарадње између Републике Србије и Португалије (2011–2012) „Транскрипциона и посттранскрипциона регулација генске експресије у врстама рода *Pisum* изложеним суши“
- 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 (ЕВБ1451). 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 самоинкомпатибилности код дивљих врста *Prunus tenella*, *Prunus webii*. Сарадња 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

- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбољи дипломски рад из области молекуларне биологије у Србији (Бојана Бановић, 2005; Живко Јовановић, 2007; Немања Станисављевић, 2010)
- Награда Фондације „Горан Љубијанкић“ за најбоље докторске дисертације из области молекуларне биологије у Србији (Гордана Тимотијевић, 2009; Драгана Николић, 2010)



## EDUCATION

From the early beginning IMGGI had a tendency to attract the most talented students of molecular biology who performed their bachelor, master and doctoral thesis. This is how IMGGE became one of the most prestigious research and educational institutions in Serbia.

IMGGE puts a great effort to provide undergraduate and PhD students with theoretical and practical knowledge enabling their efficient involvement in scientific projects as well as better networking with scientific and educational communities throughout the world. The policy of IMGGE involves stimulation of continuous theoretical and practical education at all levels of career development by acquiring modern methodologies in the fields of molecular biology, molecular genetics and biotechnology.

For three decades associates of IMGGE have been lecturing on key subjects in the field of molecular biology (Fundamentals of Molecular Biology, Molecular Genetics, Biochemistry, Molecular Biology of Eukaryotes...). Since 2004, IMGGE has been a member of the University of Belgrade, and has actively participated in educational programs of undergraduate, master and PhD studies at Faculty of Biology at the University of Belgrade.

IMGGE associates also participate in PhD studies at the Faculty of Pharmacy, specialization studies at the School of Medicine and at other faculties and universities in the country. Expertise in the field as well as up to date equipment enable IMGGE to participate in organization and realization of theoretical and practical courses, as well as, in realization of master and PhD theses.

The best proof of IMGGE's success and collaboration with numerous academic and research institutions is a significant number of completed diploma theses (184), master theses (114) and PhD theses (95) realized by students of the Faculty of Biology, the School of Medicine, the Faculty of Chemistry, the Faculty of Veterinary Medicine, the Faculty of Pharmacy, the Faculty of Dental Medicine, the Faculty of Agriculture, the Faculty of Technology and Metallurgy and the Faculty of Mining and Geology within University of Belgrade as well as the Faculty of Technical Sciences University of Novi Sad. Presently, 36 PhD students are doing their theses in IMGGE.

In the first doctorate carried out at IMGGI and defended in 1988 Dr. Radoje Drmanac disclosed the original idea of DNA sequencing by hybridization (Sequencing by Hybridization - SBH method). This pioneering work was in line with the initial idea of IMGGI - encouragement fundamental and applied research. As a result of research initiated in IMGGI, a group of collaborators led by Prof. Dr. Radomir Crkvenjakov and Dr. Radoje Drmanac, moved to Argonne National Laboratory (USA), and afterwards established a company for genomic DNA sequencing.

As of 2008, along with the Faculty of Biology and IBISS, IMGGE organizes Molecular Biology PhD program. It should be noted that some associates of IMGGE are selected by the National Council as accredited mentors for PhD studies. Besides the Faculty of Biology, IMGGE developed scientific collaboration with the School of Medicine, the Faculty of Agriculture, the Faculty of Pharmacy, the Faculty of Chemistry, the Faculty of Technology and Metallurgy, the Faculty of Dental Medicine University of Belgrade, and with other faculties and universities in the country.

Today, molecular genetics and molecular biology have tremendous value in application in medicine, veterinary medicine, dentistry, pharmacy, technology, agriculture and food industry and researchers from IMGGE organize theoretical and practical courses with national and international participation. So far, more than 150 participants from fifty institutions attended this type of training.

Beside active participation in education, IMGGE puts a great effort in the career development and motivation of researchers.

In 2003 IMGGE has established "Foundation Goran Ljubijankić" which provides support to young and promising scientists who are engaged in research in the field of molecular biology. Each year the Foundation rewards the most successful young researchers for their achievements, further stimulating their research careers. Until today Foundation awarded 42 young researchers for the best undergraduate, 27 for the best master works and 39 researchers for the best doctoral dissertation research in the field of molecular biology.

## POPULARIZATION OF SCIENCE

Molecular biology, besides information and communication technologies, is the most attractive science of our time. It progressed very fast and found large applicability in many areas (agriculture, veterinary and human medicine, ecology, biotechnology). Given the number of new and sensational discoveries in the field of molecular biology, general public, and sometimes even experts in the field have difficulties in understanding the real meaning of these findings, which sometimes causes fear of the unknown. Therefore, promotion of science and

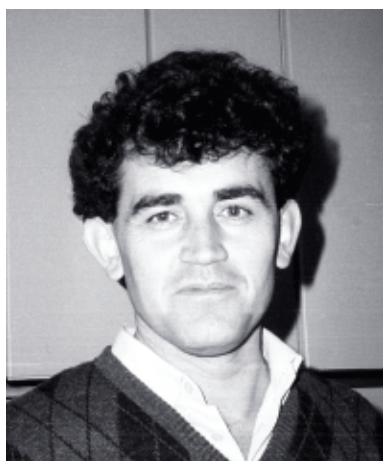


## ОБРАЗОВАЊЕ

Од самог оснивања ИМГГИ је тежио да привуче најталентованије студенте молекуларне биологије који су долазили да раде своје дипломске, магистарске и докторске дисертације и тако је ИМГГИ градио слику престижне институције како у области научних истраживања тако и у образовању. ИМГГИ улаже велике напоре како би студенти основних и докторских студија стекли током школовања, не само теоријска, већ и практична знања и како би се што брже и ефикасније укључили у реализацију научних пројеката и омогућили даље повезивање научних и наставних потенцијала у земљи и свету. Пословна политика ИМГГИ подразумева стимулисање континуираног теоријског образовања и праћење савремених методолошких приступа у области молекуларне биологије, молекуларне генетике и биотехнологије у свим фазама развоја истраживача, од истраживача-приправника до научног саветника.

Већ три деценије сарадници ИМГГИ учествују у извођењу наставе на кључним предметима из области молекуларне биологије: Основи молекуларне биологије, Молекуларна генетика, Биохемија, Молекуларна биологија еукариота... Од 2004. године ИМГГИ је чланица Универзитета у Београду и своју наставну активност највећим делом остварује кроз реализацију програма основних академских, мастер и докторских студија у оквиру Биолошког факултета. Сарадници Института учествују и у докторским студијама на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду, на специјалистичким студијама на Медицинском факултету Универзитета у Београду као и на другим факултетима и универзитетима у земљи. Кадровски и просторни ресурси омогућавају Институту да учествује како у одржавању и организацији наставе, тако и у извођењу експерименталних вежби и изради мастер и докторских радова.

О успешности сарадње са академским и истраживачким институцијама сведочи и број дипломских радова (184), магистарских и мастер радова (114) и докторских дисертација (95) који су урађени у ИМГГИ. У изради ових радова и теза били су ангажовани студенти не само Биолошког факултета, већ и студенти Медицинског, Ветеринарског, Хемијског, Фармацеутског, Пољопривредног, Стоматолошког, Технолошко-металуршког, Рударско-геолошког факултета Универзитета у Београду, као и Техничког факултета Универзитета у Новом Саду. Тренутно, у ИМГГИ, 36 докторанада ради експерименталне делове својих теза.



др Радоје Дрманец  
Radoje Drmanac, PhD

У првом докторату урађеном у ИМГГИ, одбрањеном 1988. године, др Радоје Дрманец објављује оригиналну идеју секвенцирања ДНК путем хибридизације (Sequencing by Hybridization – SBH метода). Овај пионирски рад био је у складу са почетном идејом оснивања ИМГГИ – подстицање фундаменталних и примењених истраживања. Као резултат истраживања започетих у ИМГГИ, група сарадника предвођена проф. др Радомиром Црквењаким и др Радојем Дрманцем, одлази у Argonne National Laboratory (САД) након чега оснивају компанију која се бави секвенцирањем геномске ДНК.

У сарадњи са Биолошким факултетом и ИБИСС-ом, од 2008. године ИМГГИ осмишљава и учествује у реализацији докторских студија у оквиру студијског програма „Молекуларна биологија”. Посебно треба нагласити да су поједини сарадници ИМГГИ од стране Националног савета акредитовани као ментори за докторске студије. Поред Биолошког факултета, ИМГГИ је до сада имао научноистраживачку сарадњу са Медицинским, Пољопривредним, Фармацеутским, Хемијским, Технолошко-металуршким и Стоматолошким факултетом Универзитета у Београду, као и са факултетима других универзитета у земљи.

С обзиром на све већу примену молекуларне биологије и молекуларне генетике у медицини, ветерини, стоматологији, фармацији, технологији, пољопривреди и индустрији хране, научни кадар ИМГГИ организује теоријске и практичне курсеве са националним и међународним учешћем. До сада је кроз овакав вид обуке прошло више од 150 учесника из педесет институција.

Поред активног учешћа у настави, ИМГГИ се труди да и на друге начине учествује у развоју и стимулацији научног кадра. Године 2003. ИМГГИ је основао Фондацију „Горан Љубијанкић”, чији је циљ да помогне младим и перспективним научницима из наше земље који се баве истраживањима у области молекуларне биологије. Фондација сваке године додељује награде најуспешнијим младим истраживачима за постигнуте резултате и на тај начин стимулише истраживања у области молекуларне биологије. Фондација је од оснивања до данас доделила 42 награде за најбоље дипломске, 27 награда за магистарске и мастер радове и 39 награда за најбоље докторске дисертације за истраживања у области молекуларне биологије.

## ПОПУЛАРИЗАЦИЈА НАУКЕ

Молекуларна биологија је, поред информационих технологија, најатрактивнија наука нашег доба. Њен напредак је муњевит а применљивост велика у многим областима (пољопривреда, ветеринарска и хумана медицина, екологија, биотехнологија). Због сензационалних открића која се у овој науци догађају скоро свакодневно, шира јавност, а понекад и стручна јавност не могу да



communication with the general public is used for raising awareness of the social and economic importance of scientific progress and technological development in the fields of molecular biology and molecular genetics. That is why a team of experienced researchers responsible for popularization of science gathered at IMGGE with the mission to continuously promote molecular biology in Serbia.

These activities are performed through a number of national and international programs and projects including:

- Little School of DNAlogy - program of promotion and popularization of molecular biology through the "do it yourself" experiments in the laboratory. This is realized through a traveling laboratory in primary schools and through workshops for high school students in IMGGE. Since 2009 activities of this original program included several thousand children from elementary, high school and pre-schools as well as institutions for children without parental care. Also, the contents of the program were available to the general population all around the cities. The traveling laboratory is a very attractive program for schools and manifestations that promote culture and science. "Little School of DNAlogy" reached the smallest and most remote places in Serbia.

- Scholar the Molecular - program of lectures with demonstrations for high school students about the basic concepts and basic techniques of molecular biology, which is being implemented in IMGGE.

- Researchers' Night - interactive program content including series of promotional lectures and workshops simultaneously organized in over 300 European cities every fourth Friday in September. On that day researchers from IMGGE go to parks, squares and cultural institutions to promote their scientific activities through direct communication with the public. Since 2011 IMGGE in partnership with other research institutions and faculties coordinates these projects funded by the European Commission. The first Researchers' Night included Belgrade, but this event has extended to many cities throughout Serbia.

- DNA Day - Since 2013, IMGGE in collaboration with Institut Français de Serbie organizes program of lectures and workshops on April 25th to mark the anniversary of two major scientific achievements in the field of human genetics: discovery of DNA and the completion of the Human Genome Project.

- Fascination of Plants Day - program of thematic lectures and workshops dedicated to the promotion of scientific disciplines engaged in the study of plants carried out on May 18th under the auspices of the European Organisation for Plant Biology. IMGGE is the main organizer of activities that mark this day in Belgrade since 2013.

- UniStem Day - a program of lectures and workshops organized with the goal to promote stem cell research supported by the EuroStemCell consortium. IMGGE organized it for the first time in Serbia in 2016.

- Brain Awareness Week - event organized worldwide with the aim of popularization of neurosciences. As of 2015 IMGGE, in cooperation with the Serbian Society for Neuroscience, is participating in this event with workshops for students, as well as interesting lectures for wide audience.

In the past five years, more than 20 IMGGE PhD students and postdoctoral researchers have been involved in education of high school students through programs realized in collaboration with Petnica Science Center and Center for Talented Youth Belgrade 2. IMGGE associates are involved in these programs as lecturers, mentors and committee members. Also, IMGGE associates are involved in the organization and realization of regional and national science competitions organized by Center for Talented Youth and National Contest of Research Projects for high school students, as well as International Conference for Young Scientists.

Since 2015, IMGGE - in collaboration with Center for Talented Youth Belgrade 2 and Institute of Gifted and Talent Children & Youth - organizes the "Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students", a conference dedicated to students. Science promotion and popularization is the best way to establish values in young people in order to bring prosperity to Serbia.

Science promotion and popularization is the best way to establish values in young people in order to bring prosperity to Serbia.

Science promotion and popularization is the best way to establish values in young people in order to bring prosperity to Serbia.

## INNOVATIONS AND TECHNOLOGY DEVELOPMENT

Part of IMGGE activities is oriented towards the application of knowledge and the results of fundamental research in human and veterinary medicine, pharmaceutical industry, agriculture, food industry and environmental protection.

One of IMGGE strategic goals is to create an inspiring environment for the development of innovations. From the beginning IMGGE sought to encourage creativity among scientists and thereby further increase the quality of scientific research. So far, researchers from





схвате њихов значај, нити да избегну осећања забринутости и страха, која су проузрокована непознавањем основа ове науке. Промоција науке и комуникација утичу на подизање свести становништва о друштвеном и економском значају научног напретка и технолошког развоја у областима молекуларне биологије и молекуларне генетике. У ИМГГИ постоји тим који је годинама веома активан у ширењу знања и популаризацији науке и који континуирано ради на промоцији молекуларне биологије у Србији.

Ове активности су реализоване кроз бројне националне и међународне програме и пројекте који укључују:

Малу школу ДНКлогије – програм промоције и популаризације молекуларне биологије кроз „уради сам“ експерименте у лабораторији, који се реализују као Путујућа лабораторија и као Радионица у ИМГГИ. Активностима овог оригиналног програма од 2009. године обухваћено је неколико хиљада основаца, средњошколаца и деце у предшколским установама и установама за незбринуту децу. Садржаји програма били су свима доступни у музејима, на улицама и трговима. Путујућа лабораторија је изузетно атрактиван програм за школе и организаторе манифестација које промовишу културу и науку. „Мала школа ДНКлогије“ је стигла и до најмањих и најудаљенијих места у Србији.

Школарец молекуларца – програм предавања са демонстрацијама за средњошколце о основним појмовима и базичним техникама из области молекуларне биологије који се реализује у ИМГГИ.

Ноћ истраживача – програм интерактивних садржаја са пратећом серијом промотивних предавања и радионица који се одржава истовремено у преко 300 европских градова сваког четвртог петка у септембру. Од 2011. године ИМГГИ је координатор пројекта који финансира Европска комисија и у оквиру кога, заједно са партнерима из других научних института и факултета, обележава ову манифестацију. Те године је програм обухватио Београд, али је ова манифестација у протекле четири године освојила многа места широм Србије.

Дан ДНК – ИМГГИ у сарадњи са Француским институтом обележава овај дан у Београду од 2013. године. Овај програм обухвата тематска предавања и радионице које се реализују у културним установама у центру града 25. априла. Њима се обележава годишњица два велика научна достигнућа из области хумане генетике, проналазак ДНК и завршетак пројекта „Хумани геном“.

Дан фасцинације биљкама – програм тематских предавања и радионица посвећен промоцији научних дисциплина које се баве проучавањем биљака и који се реализује 18. маја под покровитељством Европске организације за биологију биљака. ИМГГИ је носилац активности којима се овај дан обележава у Београду од 2013. године.

Дан матичних ћелија – програм предавања и радионица који се организује у циљу промовисања истраживања на пољу матичних ћелија под покровитељством конзорцијума EuroStemCell. ИМГГИ је први пут обележио овај дан у Србији 11. марта 2016. године.

Недеља свести о мозгу – манифестација која се широм света организује сваке године у циљу популаризације неуронаука. Од 2015. године, у сарадњи са Друштвом за неуронауку Србије, ИМГГИ се прикључио овој глобалној манифестацији уз занимљива предавања за све узрасте и радионице за средњошколце.

У протеклих пет година више од двадесет сарадника ИМГГИ, доктора наука и студената докторских студија активно је укључено у научну едукацију средњошколаца у области биологије и хемије кроз тематске програме који се реализују у сарадњи са Истраживачком станицом Петница и Регионалним центром за таленте Београд 2. Сарадници ИМГГИ ангажовани су у оквиру ових програма као стручни сарадници, предавачи, ментори и чланови комисија за оцену радова. Сарадници ИМГГИ такође су редовно укључени у организацију и реализацију регионалне и републичке смотре Центра за таленте и Државног првенства истраживачких радова ученика средњих школа Србије, а били су ангажовани и на скупу International Conference for Young Scientists.

Од 2015. године ИМГГИ у сарадњи са Регионалним центром за таленте Београд 2 и Институтом за надарену и талентовану децу и омладину организује студентску конференцију Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students.

Промовисање науке и њена популаризација најбољи су начин да се утиче на формирање погледа на свет и успостављање система вредности који ће Србији донети просперитет.

## ИНОВАЦИЈЕ И ТЕХНОЛОШКИ РАЗВОЈ

Део својих активности ИМГГИ усмерава ка примени знања и резултата истраживања у хуманој и ветеринарској медицини, фармацеутској индустрији, пољопривреди, прехранбеној индустрији и заштити животне средине.

Један од стратешких циљева ИМГГИ је да се обезбеди инспиративно окружење за развој иновативности. ИМГГИ од свог оснивања тежи да подстиче креативност својих истраживача и на тај начин додатно подиже квалитет својих научних истраживања. До сада је у ИМГГИ реализовано 20 иновационих и технолошких пројеката. Током година успостављена је и сарадња са привредним субјектима у земљи и иностранству.

ИМГГИ кроз различите активности мотивише истраживаче и јача свест о значају интелектуалне својине и процеса трансфера технологије у настанку иновација.



IMGGE have been involved in 20 innovation and technological projects. Over this period, a successful long-term collaboration with national and international companies has been established.

IMGGE motivates researchers and creates awareness of the importance of intellectual property and technology transfer process in the development of innovations. As a result of these activities researchers from IMGGE participated in different competitions related to best innovations and won four awards granted by the relevant Ministry (2006, 2008, 2015), one prize at the "Belgrade Venture Forum" contest (2014), as well as the award for the best invention and technical solution granted by Belgrade Chamber of Commerce in 2016.

IMGGE perceived the importance of identification, protection and commercialization of scientific results and in 2016 founded Sector for Technology Transfer to facilitate and accelerate the transfer of applicable results to innovation.

Innovation should become an integral part of all activities within IMGGE. This process will contribute to long-term networking with leading national and international research and development institutes and companies. Today, technology transfer process in IMGGE contributes both to the development of innovative products and technologies but also contributes to the development of new services offered by IMGGE. Technology transfer and innovations should provide additional funding for the research and development of IMGGE in the future.

## SERVICES

Our achievements in fundamental research provided successful application of scientific results improving the health and life quality of people and animals, increasing food safety and quality and assist the agriculture.

To meet global scientific challenges, investments in new technologies and continuous transfer of scientific results into the development and introduction of new services has been one of the key objectives of IMGGE development.

During the last thirty years of scientific activities, researchers of IMGGI intensively cooperated with numerous institutions in the field of medicine, agriculture, food production and pharmaceuticals. These cooperative networks based on applied research activities grew in time, and during this period some experimental methods were defined in form of services that were offered to potential clients. IMGGI pioneered in our country the implementation of molecular diagnostics of inherited human diseases, determination of the presence of GMO in plant material and food of plant origin, and paternity testing.

Upon the decision of Governing Board of IMGGI, in 2011, the Sector for laboratory examination was established in order to provide accredited services in the field of molecular genetics. Within its services, the Sector offers biological tests on different types of samples including plant material (seed material, food and feed), samples of human origin (amniotic fluid, chorionic villi, blood, bone marrow, buccal swab) and cytogenetic preparations.

IMGGE has established successful cooperation with the most prominent medical institutions in Serbia and the Balkans. As a result of these collaborations, the Sector continuously improves medical practice through the development and introduction of molecular genetics testing for different genetic disorders, cancers, rare diseases, as well as through the development of pharmacogenetic tests for the assesment of individual response to therapy. The Sector also introduced service of analysis of genetic markers for the selection of economically important traits in animal production. For some genetic testing, Sector presents a unique place in the Balkans where these analyses are performed.

In order to improve food safety in our country, the Sector established a service for the detection, identification and quantification of genetic modifications present in plant material and food of plant origin.

In 2012, the Accreditation Body of Serbia approved accreditation for 13 molecular genetics tests and, since then, these tests are performed in accordance with the requirements of ISO/IEC 17025:2006 (accreditation No. 01-363).

In addition to the accredited services, IMGGI also provides specific services on demand, including genotyping and molecular identification of bacteria, construction of unique starter cultures for probiotic dairy beverage, yoghurts and cheeses, as well as quantification of live bacteria in different samples.

Teams of researchers within IMGGE who are involved in the development and implementation of services encompass experts with years of experience and expertise in the field of molecular genetics. Application of modern molecular methods enabled IMGGE to provide services of the highest standards and quality.



Захваљујући овим активностима сарадници ИМГГИ су учествовали на такмичењима за најбоље технолошке иновације и остварили успех тако што су до сада освојили четири награде које је доделило ресорно Министарство (2006, 2008, 2015), једну награду на такмичењу „Belgrade Venture Forum” (2014) као и награду Привредне коморе Београда за најбољи проналазак и техничко решење (2016).

ИМГГИ је препознао значај идентификације, заштите и комерцијализације научних резултата и 2016. године основао Сектор за трансфер технологије како би олакшао и убрзао трансфер примењивих резултата ка иновацијама.

Иновације треба да постану интегрални део свих активности у оквиру ИМГГИ. Овај процес треба да допринесе дугорочном повезивању са водећим домаћим и страним истраживачко-развојним и привредно-производним организацијама. Данас, процес трансфера технологија доприноси не само развоју иновативних производа и технологија већ и развоју нових услуга које ИМГГИ пружа. Трансфер технологија и иновације требало би да у будућности обезбеде додатно финансирање научних пројеката и допринесу даљем развоју ИМГГИ.

## УСЛУГЕ

Резултати остварени у истраживањима омогућили су њихову успешну примену у циљу побољшања здравља и квалитета живота људи и животиња, повећања безбедности и квалитета хране и унапређења пољопривреде.

Како би пратили савремене светске токове, један од кључних циљева развоја ИМГГИ представља улагање у нове технологије и континуирану примену научних резултата у развијању и увођењу нових услуга.

У оквиру реализације научних пројеката, ИМГГИ је интензивно сарађивао са више институција у области медицине, пољопривреде, производње хране и фармације. Сарадња се одвијала кроз примењене програме који су временом прерасли у потребу да поједине експерименталне методе буду дефинисане као услуге и да као такве буду понуђене потенцијалним корисницима. ИМГГИ је био пионир у нашој земљи у увођењу молекуларне дијагностике наследних болести човека, утврђивању присуства ГМО у биљном материјалу и храни биљног порекла и утврђивању очинства. Одлуком Управног одбора ИМГГИ, 2011. године основан је Сектор за лабораторијска испитивања са циљем пружања акредитованих услуга лабораторијских испитивања из области молекуларне генетике. У оквиру Сектора врше се услуге биолошког испитивања на биљним узорцима (семенски материјал, животне намирнице и храна за животиње), хуманим узорцима (амнионска течност, хорионске ресице, крв, коштана срж, букални брис) и цитогенетичким препаратима.

ИМГГИ има континуирану и успешну сарадњу са еминентним здравственим установама у Србији и земљама Балкана. Стечено знање се, кроз услуге Сектора, примењује на стално унапређење медицинске праксе увођењем молекуларногенетичке дијагностике генетичких поремећаја, малигнитета, ретких болести, као и кроз развој фармакогенетичких тестирања за процену индивидуалног одговора на примењену терапију. У оквиру Сектора уведена је и услуга анализе генетичких маркера у циљу селекције особина од економског значаја код домаћих животиња. За нека генетичка тестирања, Сектор је јединствено место на Балкану где се могу урадити ове анализе.

У циљу побољшања безбедности хране установљена је услуга детекције, идентификације и квантификације генетичких модификација присутних код биљака и у храни биљног порекла.

Сектор је 2012. године од стране Акредитационог тела Србије добио акредитацију за 13 молекуларногенетичких тестова и од тада се ове анализе обављају сагласно захтевима стандарда ISO/IEC 17025:2006 (број акредитације 01-363).

Поред акредитованих услуга ИМГГИ пружа специфичне услуге на захтев корисника, укључујући молекуларну идентификацију и генотипизацију бактерија, конструкцију јединствених стартер култура за пробиотичке млечне напитке, јогурте и сиреве, као и квантификацију живих бактерија у различитим узорцима.

Тимови истраживача који развијају услуге у оквиру ИМГГИ укључују најбоље стручњаке са вишегодишњим искуством и експертизом у области молекуларне генетике. Примена најсавременијих молекуларних метода омогућава да ИМГГИ пружа услуге највишег стандарда и квалитета.



## NATIONAL COLLABORATION

- Center for Food Analysis, Belgrade
- Central Institute for Conservation, Belgrade
- Clinical Center of Serbia, Belgrade
- Clinical Center of Vojvodina, Novi Sad
- Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Belgrade
- Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade
- Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade
- Faculty of Mining and Geology, University of Belgrade, Belgrade
- Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade
- Faculty of Philosophy, University of Belgrade, Belgrade
- Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade
- Faculty of Technology, University of Novi Sad, Novi Sad,
- Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Nis, Nis
- Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac
- Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad
- Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology and Immunology
- Fruit Research Institute, Čačak
- Galenika a.d., Belgrade
- Gynecology and Obstetrics Clinic “Narodni Front“, Belgrade
- Gynecological Hospital Sretenović, Belgrade
- Institute for Applied Nuclear Energy INEP, University of Belgrade, Belgrade
- Institute for Biological Research “Siniša Stanković“, University of Belgrade, Belgrade
- Institute for Experimental Phonetics and Speech Pathology, Belgrade
- Institute for Medicinal Plants Research “Dr Josif Pančić“, Belgrade
- Institute for Medical Research, Belgrade
- Institute for Multidisciplinary Research, Belgrade
- Institute for Philosophy and Social Theory, University of Belgrade, Belgrade
- Institute for Plant and Environmental Protection
- 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,
- 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
- Institute of Technical Sciences of SASA
- Life Activities Advancement Center, Belgrade
- Maize research Institute “Zemun Polje“, 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
- Mining and Metallurgy Institute Bor, Bor
- Mother and Child Health Institute of Serbia “Dr. Vukan Čupić“, Belgrade
- National Blood Transfusion Institute, Belgrade
- National Cancer Research Center, Belgrade
- National Library of Serbia, Belgrade
- PKB INI Agroekonomik, Padinska Skela, Belgrade
- Razanj Municipality, Razanj
- School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade
- Scientific Veterinary Institute “Novi Sad“, Novi Sad
- Specialized Veterinary Institute “Subotica“, Subotica
- Technical Test Center, Belgrade
- The Jaroslav Černi Institute for the Development of Water Resources
- University Children’s Hospital, Belgrade:
- University Clinical Center Zvezdara, Belgrade
- Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade
- VetLab, Belgrade

## COLLABORATION WITH INDUSTRY

- AbelaPharm, Belgrade
- Dairy “Petrov“, Veliko Srediste
- Inventlab, Adasevci
- Medico Domus, Nis
- Veterinary Station “Koker“, Adasevci



## САРАДЊА У ЗЕМЉИ

- Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Ветеринарски специјалистички институт „Суботица“, Суботица
- ВетЛаб д.о.о., Београд
- Војномедицинска академија, Београд
- Галеника а.д., Београд
- Гинеколошка болница Сретеновић, Београд
- Гинеколошко-акушерска клиника „Народни фронт“, Београд
- Институт друштвених наука, Београд
- Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, Београд
- Институт за водопривреду „Јарослав Черни“, Београд
- Институт за воћарство и виноградарство, Чачак
- Институт за експерименталну фонетику и патологију говора, Београд
- Институт за заштиту биља и животну средину, Београд
- Институт за здравствену заштиту мајке и детета „Др Вукан Чупић“, Београд
- Институт за кукуруз „Земун Поље“, Београд
- Институт за ментално здравље, Центар за медицинску генетику, Београд
- Институт за медицинска истраживања, Београд
- Институт за мултидисциплинарна истраживања, Београд
- Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду, Београд
- Институт за онкологију и радиологију Србије, 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
- Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“, Београд
- Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад
- Институт за рударство и металургију Бор, Бор
- 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
- Институт за хигијену и технологију меса, Београд

- Институт техничких наука САНУ, Београд
- Клиничко-болнички центар „Др Драгиша Мишовић“, Београд
- Клинички центар Војводине, Нови Сад
- Клинички центар Србије, Београд
- Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Народна библиотека Србије, Београд
- Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад
- Општина Ражањ, Ражањ
- ПКБ ИНИ Агроекономик, Падинска Скела
- Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу, Ниш
- Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
- Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад
- Рударско-геолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Технички опитни центар, Београд
- Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад
- Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Универзитетска дечија клиника, Београд
- Универзитетски клинички центар Звездара, Београд
- Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд
- Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Филозофски факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Хемијски факултет, Универзитет у Београду, Београд
- Центар за испитивање намирница, Београд
- Центар за медицинску генетику, Институт за здравствену заштиту деце и омладине Војводине, Нови Сад
- Центар за унапређење животних активности, Београд
- Централни институт за конзервацију – ЦИК, Београд

## САРАДЊА СА ИНДУСТРИЈОМ

- AbelaPharm, Београд
- Ветеринарска станица „Кокер“, Адашевци
- Инвентлаб, Адашевци
- Medico Domus, Ниш
- Млекара „Петров“, Велико Средиште



## Међународна сарадња International Collaborations

### Аустрија / Austria

Department of Pharmacognosy, University of Vienna, Vienna

### 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

National Technical University of Athens, Athens

University of Patras, School of Health Sciences, Department of Pharmacy, Patras

### Ирска/Ireland

“Bioplastech Ltd.”, Dublin, Ireland

University College Dublin, Dublin

### Италија / Italy

Centro Ricerca M. Tettamanti, Università di Milano-Bicocca, Monza

Department of Biosciences, University of Milan, Milan

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

### Јапан / Japan

Nagoya University Graduate School of Medicine, Department of Pathophysiological Laboratory Sciences

### Мађарска / Hungary

Institute of Experimental Medicine of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

National Agricultural Research and Innovation Centre, Research Institute for Fisheries and Aquaculture (NAIK-HAKI), Szarvas

### Немачка / Germany

Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Response in Aging-Associated Diseases

(CECAD), University of Cologne, Cologne

Department of Developmental Genetics, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim

Laboratory for Plant Molecular Physiology, Heidelberg Institute for Plant Sciences, Heidelberg

Friedrich Baur Institut, Department of Neurology,

Ludwig Maximilians University, Munich

Institute for Mitochondrial Genetics and Ageing, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne

Institute of Radiation Biology, Helmholtz Center Munich, Munich

Technical University of Munich, Department of Chemistry, Munich

### Пољска / Poland

Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University

Division of Molecular and Forensic Genetics, Department of Forensic Medicine, Ludwik Rydygier

### Норвешка / Norway

Norwegian University of Life Sciences, As

### Португалија / Portugal

Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) Oeiras

### Русија / Russia

Institute of Biological Problems of the North, Russian Academy of Sciences, Madagan

### Република Словачка / Slovakia

Comenius University in Bratislava

### Сједињене Америчке Државе / USA

Argonne National Laboratory, Material Science Division, Argonne, Illinois

Complete Genomics, Mountain View, California  
Department of Biochemistry, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia

Department of Radiation Oncology, Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago

University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois

University of Miami Miller School of Medicine, Department of Dermatology and Cutaneous Surgery

University of Montana, Chemistry Department, MT, USA Missoula, Montana

University of Washington, Department of Genome Sciences, Seattle, Washington

### Словенија / Slovenia

Department of Molecular Genetics, Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana

Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana

Jožef Štefan Institute, Ljubljana

National Institute of Biology NIB 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

John Walton Muscular Dystrophy Research Cen-

tre, Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne

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

### Хрватска / Croatia

Department of Molecular Medicine, Rudjer Boskovic Institute, Zagreb

### Чешка Република / Czech Republic

Institute of Biology and 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

PhytoNet AG, Schindellegi-Feusisberg

### Шведска / Sweden

Karolinska Institute, Stockholm

### Шпанија / Spain

Biodonostia Institute, San Sebastian

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

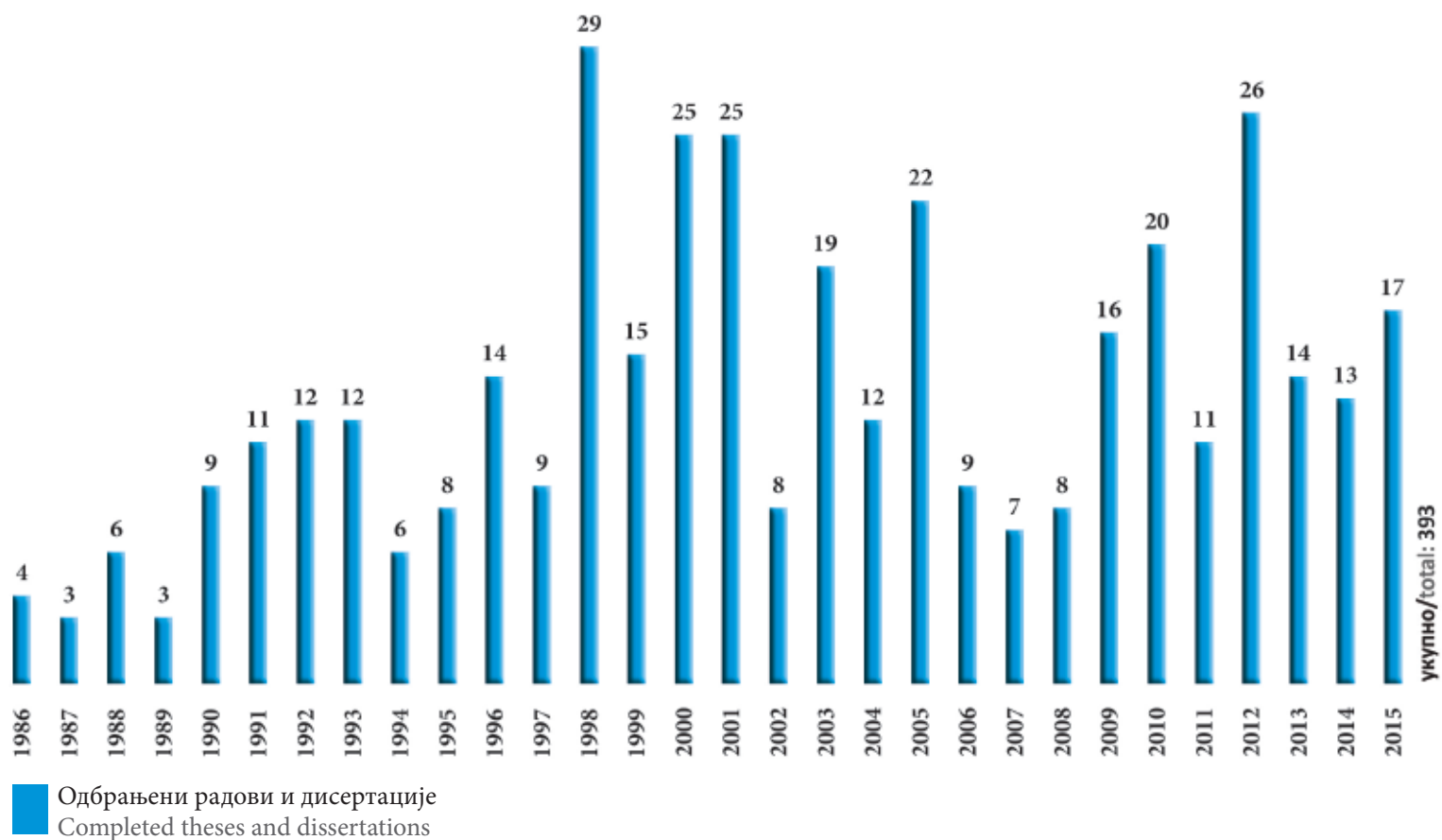
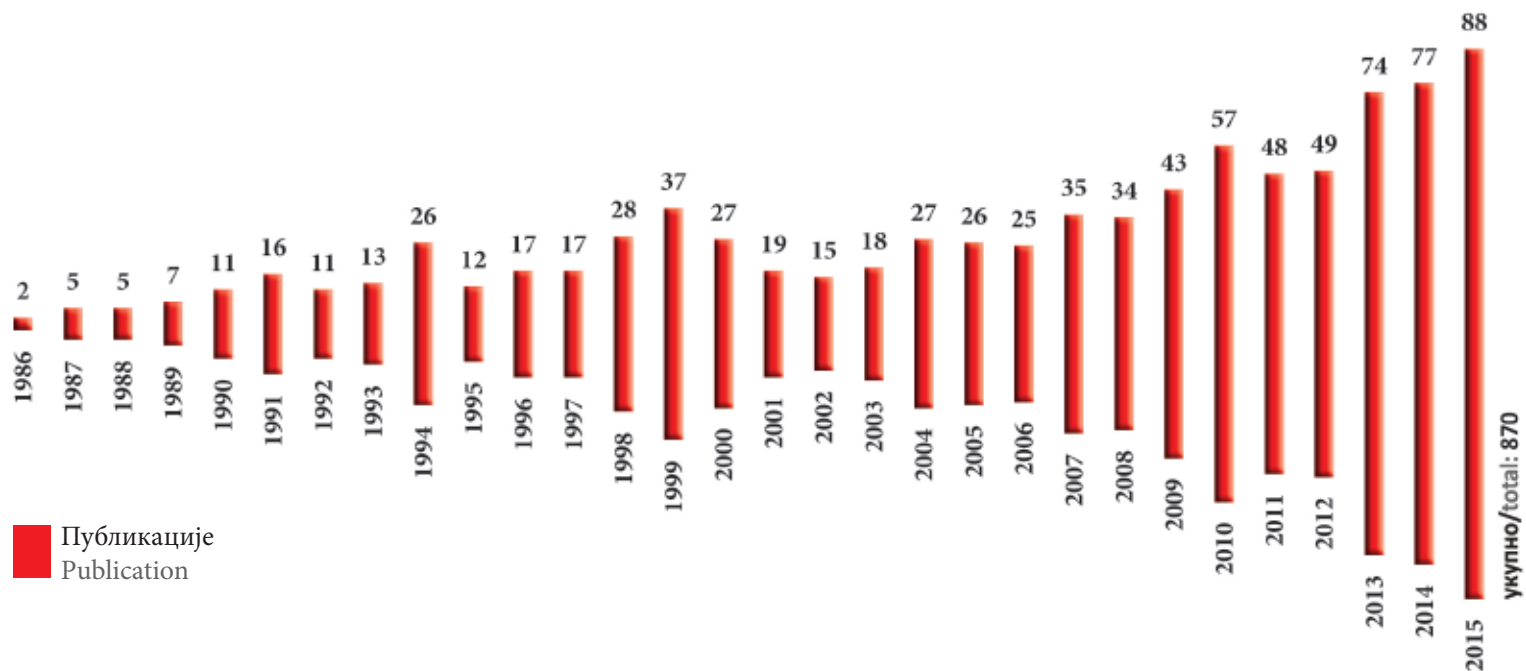
Inter-University Chair in Law and Human Genome, University of Deusto and University of Basque Country, Bilbao

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Villaviciosa, Principado de Asturias

Instituto de Biomedicina y Biología de Cantabria, Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria



## Публикације и развој научног кадра Publications and Theses



Пријатељи ИМГГИ  
Friends of IMGGE





CIP - Каталогизација у публикацији  
Народна библиотека Србије, Београд

601.4:577.21]:005.71(497.11)"1986/2016"

ИНСПИРИСАНИ науком : тридесет година ИМГГИ = Inspired by Science :  
thirty years IMGGE / [уредници Беговић Јелена, Страхинић Ивана, Морић  
Ивана]. - Београд : Институт за молекуларну генетику и генетичко  
инжењерство, 2016 (Београд : Алта Нова). - 79 стр. : илустр. ; 30 cm

Упоредо срп. текст и енгл. превод. - Тираж 300

ISBN 978-86-82679-10-3

1. Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (Београд)  
а) Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (Београд) -  
1986-2016  
COBISS.SR-ID 223106060