

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 05.09.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Милана Којића и др Бранка Јовчића о урађеној докторској дисертацији **Марије С. Миљковић**, истраживача сарадника у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Београд, под насловом „**Карактеризација AggLb агрегационог фактора соја *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Милан Којић, научни саветник Института за Молекуларну генетику и генетичко инжењерство, др Бранко Јовчић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Јелена Лозо, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Милорад Којић, научни саветник Института за Молекуларну генетику и генетичко инжењерство.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и на основу анализе приложене докторске дисертације Већу подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Марије С. Миљковић** под насловом „**Карактеризација AggLb агрегационог фактора соја *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64**“, написана је на 139 страна (проред 1,5), у оквиру којих се налази 7 табела, и 19 слика. У докторској дисертацији је цитирано 197 извора литературе. Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима, Литературу, Биографију аутора и Прилоге. Текст дисертације садржи следећа поглавља: **Увод** (стр. 1-25), **Циљ рада** (стр. 26-28), **Материјал и методе** (стр. 29-57), **Резултати** (стр. 58-89), **Дискусија** (стр. 90-105), **Закључци** (стр. 106-108) и Литература (стр. 109-130). Поред наведеног у прилогу садржи: Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације, Изјаву о коришћењу као и одштампане научне радове објављене у научним часописима са ISI листе који су директно проистекли из докторске дисертације.

2. АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи пет потпоглавља. У њему је дат сажет приказ досадашњих знања из литературе која су непосредно везана за предмет докторске дисертације.

У потпоглављу "Бактерије млечне киселине – опште карактеристике" дат је опис општих карактеристика бактерија млечне киселине. У делу "Род *Lactobacillus* – опште карактеристике" описани су методи детерминације лактобацила, класификација лактобацила на основу типа ферментације (метаболизма глукозе) и продуката које синтетишу, истакнут је велики диверзитет поменутог рода (да је најбројнији род по броју

врста у оквиру бактерија млечне киселине), различита станишта које врсте настањују, као и њихове физиолошке, филогенетске и генетичке разлике. Истакнут је такође значај лактобацила за здравље људи и дати различити примери њиховог пробиотичког деловања, као и примери њихове употребе у производњи широког спектра ферментисаних производа. У потпоглављу "Пробиотици", дата је дефиниција пробиотика према (FAO-WHO, 2006; Guarner and Schaafsma, 1998), описани су позитивни ефекти лактобацила на здравље људи и животиња и напредак истраживања на овом пољу. Затим су описани "Основни критеријуми за одабир пробиотика" где је истакнуто да анализирани сој мора најпре бити детерминисан до нивоа соја и да испуни основне критеријуме да би могао добити статус пробиотика као што су: да поред позитивног ефекта на организам не поседује факторе вируленције, не носи гене за резистенцију на антибиотике и да продукује антимицробне супстанце. Способност адхезије лактобацила, позитивно својство у селекцији пробиотика, је детаљно описано као и механизам позитивног деловања. Истакнуто је да потенцијални пробиотички сој треба да поседује и способност преживљавања услова гастроинтестиналног тракта као и технолошког процеса обраде. У одељку "Механизми остваривања пробиотичког ефекта" приказани су литературни подаци о конкретним механизмима описаних сојева којима они постижу позитиван ефекат на здравље људи, а који се огледају у формирању услова који не погодују расту патогена као што је снижавање рН средине, синтеза различитих антимицробних и других једињења, затим у смањењу нивоа холестерола, ексклузији или елиминацији патогена као и кроз имуномодулаторну активност и регулацију генске експресије у еукариотским ћелијама. Затим су наведени најпознатији сојеви лактобацила који су у свакодневной употреби, као пробиотици. У потпоглављу "Површинске карактеристике бактерија рода *Lactobacillus*" описан је значај и хетерогеност молекула лоцираних на површини ћелија у њиховом одговору на промене услова спољашње средине. Дат је детаљан опис структуре ћелијског зида и типова молекула који могу бити асоцирани, укотвљени или ковалентно везани на површини ћелија. Затим су издвојени и детаљно описани молекули који доприносе адхезији ћелија као што су: протеини С слоја, агрегациони фактори, мукус везујући протеини, протеини који се везују за колаген и фибронектин, пили и непротеински адхезини. С обзиром да су геноми великог броја сојева лактобацила секвенцирани указан је и значај биоинформатиче анализе генома у одабиру пробиотичких сојева. Истакнуто је да мали број сојева лактобацила показује способност формирања биофилма (*Lb. rhamnosus* GG) и описана је улога ове способности појединих сојева, услови који индукују формирање биофилма, компоненте које чине матрикс (протеини, угљени хидрати) и гени који су одговорни. У одељку "Агрегациони фактори бактерија рода *Lactobacillus*" најпре је дата дефиниција феномена аутоагрегације и коагрегације. Затим су наведени до сада описани агрегациони фактори лактобацила где је истакнута хетерогеност ових молекула по молекулској маси и структури. Иако су у последње време, с обзиром на њихов значај, интензивирани истраживања агрегационих фактора лактобацила, механизми деловања још нису у потпуности разјашњени. Сматра се да бактерије које експримирају агрегационе факторе испољавају селективну предност у везивању за компоненте ванћелијског матрикса и тако обезбеђују са једне стране задржавање у гастроинтестиналном систему домаћина, а са друге стране доприносе заштити домаћина тако што спречавају патогене да се везују за исте компоненте ванћелијског матрикса. Показано је да су по својој природи молекули који доприносе агрегацији протеини, али могу бити и егзополисахариди. На крају су наведени упечатљиви "Примери позитивног утицаја бактерија рода *Lactobacillus* у превенцији и побољшању симптома различитих здравствених проблема" у лечењу ентеричних инфекција, дијареа, инфламаторних болести црева, иритабилног цревног синдрома, Кронове болести, обнављању микобиоте након антибиотске терапије као и третману урогениталних инфекција и инфекција усне дупље. Поред инфективних болести

позитиван ефекат лактобацила је примећен и код метаболичких и кардиоваскуларних болести као што су повишен ниво холестерола, триглицерида и код дијабетеса.

У последњем потпоглављу ”Природни изолати бактерија рода *Lactobacillus*” кандидаткиња је описала значај, односно предност, природних изолата као објекта истраживања с обзиром да су сојеви који су анализирани у овој студији били природни изолати из различитих млечно киселинских производа сакупљени са различитих локација западног Балкана.

У поглављу **Циљеви рада** дефинисана су три главна научна циља докторске дисертације.

Први научни циљ био је да се претражи лабораторијска колекција лактобацила и изолују сојеви који показују способност агрегације. Да се дефинишу разлике међу сојевима по брзини седиментације и типу формираних агрегата као и да се тестира протеинска природа агрегационих молекула.

Други постављени научни циљ био је утврђивање локација гена, детерминисање генетичке основе агрегације, клонирање гена за бар један од новооткривених фактора агрегације и структурна карактеризација клонираног агрегационог фактора.

Трећи научни циљ био је функционална карактеризација агрегационог фактора и утврђивање улоге поновљених домена у аутоагрегацији, везивању за колаген и фибронектин, као и у формирању биофилма (конструкцијом великог броја варијанти агрегационог протеина).

У поглављу **Материјал и методе** наведене су хемикалије и апарати који су коришћене у раду, као и детаљан опис поступака који су примењивани у манипулацији са коришћеним бактеријама, њиховим протеинима и генетичким материјалом. У овом поглављу кандидаткиња је описала велики број метода које је користила током израде тезе из различитих области: методе рада на бактеријама, на протеинима, на ДНК, као и статистичкој обради података, подељених у 7 подпоглавља.

Ово поглавље је започето листом сојева бактерија, плазида и конструктора коришћених у раду. Затим су набројани медијуми који су коришћени за раст различитих сојева бактерија. Следио је опис метода које су коришћене при раду са бактеријама (методе изолације и детерминације сојева, чишћења плазида, припрема и трансформација различитих бактеријских ћелија, методе за анализу способности агрегације, коагрегације везивања за колаген и фибронектин и формирања биофилма), методе рада са ДНК [методе изолације и пречишћавања тоталне и плазмидне ДНК из различитих сојева бактерија, ензимске реакције са ДНК: дигестије ДНК рестрикционим ензимима, дефосфорилација, лигације ДНК фрагмената, секвенцирање и умножавање ДНК методом ланчане полимеризације (PCR); електрофореза ДНК фрагмената (класична хоризонтална и у пулсирајућем пољу), елуција ДНК из гела, пренос на најлонску мембрану и Southern хибридизација са обележеним ДНК пробама, конструкција плазмидне библиотеке, конструкција делетаната], методе рада са протеинима (оверекспресија протеина, пречишћавање и одређивање концентрације протеина, електрофореза протеина на полиакриламидним геловима и дот блот анализа) и статистичка обрада добијених резултата.

У поглављу **Резултати** изложени су резултати истраживања који су груписани у две целине: у првом делу је претражена лабораторијска колекција и анализирани су сојеви лактобацила који поседују добру агрегациону активност, где је посебна пажња посвећена соју BGNJ1-64 из кога је клониран ген за агрегациони протеин лактобацила и урађена детаљна анализа овог гена и протеина, док је у другом делу урађена анализа улоге домена

AggLb протеина у остваривању функција овог молекула. Анализом ЛИММ лабораторијске колекције лактобацила од око 1000 анализираних изолата одабрано је само 11 сојева који показују јаку агрегациону активност (BGSJ2-8, BGGR2-68, BGGR2-82, BGDП1-84, BGDП9-38, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-64, BGNJ1-70, BGZLS30-6 и BGAR75) Овај податак указује на чињеницу да агрегација није чест фенотип те да сојеви који агрегирају чине само 1% сојева из колекције. Одабрани Agg⁺ сојеви лактобацила су могли да се групишу у три групе на основу брзине агрегације и типа формираних агрегата (на брзе, средње и споре који формирају велике агрегате сличне пахуљама снега, средње величине и ситне агрегате). Установљена је директна корелација између брзине агрегације и типа формираних агрегата. Полазећи од чињенице да сличан фенотип обезбеђује и агрегациони фактор лактокока, за који је показано да омогућава и везивање ћелија за колаген и фибронектин детаљно је анализирана способност свих сојева лактобацила који поседују способност агрегације за везивање за колаген и фибронектин. Установљено је да постоји велика варијабилност сојева према њиховој способности везивања за компоненте ванћелијског матрикса (колаген и фибронектин) која варира од изузетно јаких до оних код којих ово својство одсуствује. Такође, примећено је и да неки сојеви показују способност формирања биофилма. Анализом плазмидног састава сојева кандидаткиња је констатовала да сви сојеви лактобацила који агрегирају поседују велике плазмиде (веће од 20 килобаза) и недвосмислено је потврдила плазмидну локацију гена за агрегациони фактор код два соја (BGNJ1-64 и BGSJ2-8) поступком чишћења плазмида при чему су добијени деривати који су изгубили својство агрегације. Већина агрегационих фактора описаних у литератури су протеинске природе тако да су урађени експерименти утврђивања протеинске природе агрегационог фактора у соју BGNJ1-64. Протеинска природа агрегационог фактора соја BGNJ1-64 је потврђена на два начина (фенотипски и посматрањем ћелија под имунофлуоресцентним микроскопом) након третмана протеиназом К. С обзиром да је већина сојева испољавала сличан агрегациони фенотип соју лактокока у коме је откривен нови тип агрегационог фактора AggL, лактобацилусни сојеви су тестирани на присуство гена који поседују неки степен хомологије са *aggL* геном лактокока у експерименту ДНК-ДНК хибридизације; установљено је да су гени одговорни за агрегацију у лактобацилусним сојевима другачији од *aggL* гена лактокока. Полазећи од чињенице да су код сојева BGNJ1-64 и BGSJ2-8 гени за агрегациони фактор лоцирани на плазмиду кандидаткиња је конструисала плазмидне библиотеке ова два соја коришћењем већег броја рескрипционих ензима. Успешно је селектовала један клон рLА35 који носи *SacI* фрагмент од 11,4 килобаза који доводи до поновне појаве агрегационог фенотипа хетерологог домаћина BGKP20-1. Кандидаткиња је успешно секвенцирала наведени фрагмент при чему је услед присуства поновњених секвенци унутар гена применила два приступа: субклонирање мањих фрагмената и делециона анализа ЕхoIII и S1 нуклеазама. Установила је да сој BGNJ1-64 поседује до сада неокarakterисан ген (*aggLb*) за агрегациони фактор лактобацила лоциран на плазмиду рNJ1 овог соја. Поред експресије агрегационог фенотипа у лактококама *aggLb* ген је успешно експримиран и у соју *Enterococcus faecalis* BGZLS10-27. Установљено је да AggLb протеин поседује доменску организацију сличну оној коју показује и AggL агрегациони фактор лактокока иако не показују хомологију секвенце на ДНК и протеинском нивоу.

Затим је урађена функционална анализа агрегационих протеина где је показано да се интеракција ћелија са компонентама ванћелијског матрикса (колагеном и фибронектином) одиграва специфично преко AggLb агрегационог протеина. Поред тога што је агрегациони протеин директно укључен у интеракције између ћелија и компоненти ванћелијског матрикса показано је да AggLb протеин доминантно детерминише и површинске карактеристике ћелија носиоца (ћелије које експримирају показују изузетну хидрофобност површине).

С обзиром да је показано да AggLb протеин није укључен у коагрегацију са патогеним сојевима, а показује изузетну способност везивања за компоненте ванћелијског матрикса урађени су експерименти ексклузије патогених сојева *Staphylococcus aureus* ATCC25923 и *Escherichia coli* O157:H7, где је показано да ћелије које експримирају AggLb протеин на површини показују изузетну способност спречавања везивања патогена за исте компоненте ванћелијског матрикса тј. да су веома добри компетитори.

AggLb протеин лактобацила се састоји од два типа домена чији број поновака варира (6 колаген везујућих веома хетерогених домена на аминокрају терминалне домене и 20 скоро идентичних SpaB-like домена на карбоксилном крају протеина). Улога поновљених домена у протеину није позната тако да је кандидаткиња урадила делециону анализу гена пазећи да се све варијанте протеина експримирају у сличном броју молекула. Да би конструисала варијанте AggLb протеина које садрже различит број колаген везујућих домена и SpaB-like домена искористила је рестрикциона места за *HindIII* и *SspI* рестрикционе ензиме јер већина комбинација делеција фрагмената приликом религације обезбеђује поновно спајање фрагмената у оквиру читања током транслације. Пре функционалне анализе различите варијанте AggLb протеина су експримиране под идентичним промотором и потврђена је уједначена експресија Дот блот анализом користећи антитело које препознаје епитопе у свим варијантама. Анализирајући способност различитих варијанти AggLb протеина да везују колаген и фибронектин као и да индукују аутоагрегацију ћелија кандидаткиња је установила да су за испољављење ова три својства одговорни колаген везујући домени II, III и IV, док је претпостављена функција SpaB-like домена истравање колаген везујућих домена на што већу удаљеност од ћелија како би били доступнији компонентама ванћелијског матрикса. Такође је примећено да неке од варијанти AggLb протеина омогућавају формирање биофилма што је у досадашњим експериментима било у обрнутој корелацији са аутоагрегацијом, везивањем за колаген и фибронектин. У функционалној анализи различитих варијанти AggLb протеина кандидаткиња је показала да протеини могу попримити нове функције када им се уклоне неки од доминантних домена.

Анализирани сојеви лактобацила који испољавају својство агрегације могу се поделити у три групе према брзини агрегације и типу формираних агрегата. Када је детеминисана комплетна секвенца *aggLb* гена кандидаткиња је желела да установи који све анализирани сојеви поседују ген хомолог *aggLb* гену. У те сврхе дизајнирала је прајмере који умножавају почетак, средину и крај *aggLb* гена. На основу добијених ампликона у PCR реакцијама са дизајнираним прајмерима установила је да 5 сојева поседује гене који су високо хомологи *aggLb* гену лактобацила. Дизајнирани прајмери су селективни за детекцију истоветних гена и биће коришћени у даљој селекцији агрегационих фактора. Сојеви BGAR75, BGGR2-68 и BGGR2-82 су дали у амплификацији са прајмерима који су дизајнирани на основу секвенце у оквиру 5' краја *aggLb* гена слаб сигнал указујући на могућност да агрегациони фактори ова три соја поседују мали степен хомологије са *aggLb* геном. Добијени резултати указују на велику разноврсност агрегационих фактора лактобацила јер је у оквиру само једне врсте унутар лабораторијске колекције детектовано највероватније три различита агрегациона фактора.

У поглављу **Дискусија** дата је упоредна анализа оригиналних резултата ове докторске дисертације и података из литературе, која указује на значај постигнутих резултата. У овом раду је изоловано 11 сојева лактобацила који поседују способност агрегације, клониран је и детаљно окарактерисан нови агрегациони фактор лактобацила.

Кандидаткиња је дискутовала о изузетно важној улози површинских молекула бактеријских ћелија, о њиховој разноврсности и улози у међућелијској комуникацији и одговору на промене спољашње средине. Конкретно је наводила резултате других

истраживања у којима је потврђена повезаност између структуре и функције површинских молекула. С обзиром да су истраживања везана за позитиван ефекат лактобацила показала да је пробиотичка способност својство сваког соја понаособ, фокус истраживања других лабораторија је оријентисан на утврђивање директних молекула и механизма активности. Такође и ова истраживања су била усмерена у истом правцу-да се открије нови агрегациони фактор лактобацила, опише његова улога у пробиотичкој активности као и да се утврде механизми деловања. Способност агрегације лактобацила, али и других бактерија, показала се као ретко својство (присутно од 1 - 2%) са великим диверзитетом гена. Механизми интеракције са патогенима којима пробиотици доприносе побољшању организма су у литератури углавном раздвојени на могућу коагрегацију са патогеном што резултује његовом елиминацијом перисталтиком или ексклузију патогена везивањем за исте рецепторне молекуле ванћелијског матрикса. Ови механизми како је и кандидаткиња установила не могу истовремено бити присутни у једном соју јер би имали супротан ефекат. AggLb агрегациони протеин испољава своју активност кроз везивање за компоненте ванћелијског матрикса (колаген и фибронектин) и ексклузију патогена слично агрегационом протеину лактокока са којим показује структурну сличност и функцију. AggLb агрегациони протеин припада новој групи агрегационих фактора велике молекулске масе и мултидоменске структуре. Анализом литературних података кандидаткиња је констатовала да су слични агрегациони фактори присутни и код других сојева лактобацила али они нису функционално окарактерисани већ су подаци добијени биоинформатичком анализом секвенцираних генома. Иако су ти отворени оквири читања означени као непознати, на основу секвенце се може закључити да су то агрегациони фактори. Такође и фактори вируленције који се везују за компоненте ванћелијског матрикса поседују мултидоменску структуру што указује да је таква структура детерминисана функцијом специфичног везивања о чему је кандидаткиња дискутовала. Интересантно је да је значајан број гена за агрегационе факторе лоциран на великим плазмидима који се стабилно одржавају без селекције указујући на друге механизме који доприносе одржавању ових гена услед њихове важности за бактерије. С обзиром да је структура AggLb агрегационог протеина веома сложена сви домени присутни у овом молекулу су детаљно дискутовани (присуство лидер секвенце за избацивање из ћелије, колаген везујући домени одговорни за везивање за компоненте ванћелијског матрикса, SpaB-like домени за које се претпоставља да служе истицању других домена на површини, присуство LPXTG измењене секвенце за укотвљавање у мембрану). Кандидаткиња је такође дискутовала и о јединственим приступима које је применила у овом раду како би заокружила информације о величини агрегационог фактора и утврдила доприносе појединачних домена. Такође је дискутован интересантан феномен промене функције протеина који се ретко среће у природи, као што је у случају AggLb агрегационог протеина који може да омогући вишећелијске асоцијације као што су агрегација и формирање биофилма. Кандидаткиња је дефинитивно показала да добијени резултати подржавају хипотезу да је за функцију агрегационих фактора битнија структурна сличност (велики број поновака) од сличности на нивоу ДНК или распореда аминокиселина у протеину.

У поглављу **Закључци**, сажето и јасно су изнети најважнији закључци до којих се дошло анализирањем добијених експерименталних резултата на основу којих је потврђено да су остварени постављени циљеви и потврђене хипотезе докторске дисертације. На основу добијених резултата донето је седам закључака који потврђују актуелност истраживања, значај добијених резултата на светском нивоу, као и полазну основу за будућа истраживања. На основу анализе лабораторијске колекције лактобацила кандидаткиња је одабрала 11 сојева што представља око 1% од укупно анализираних

сојева указујући да је ово својство веома ретко међу лактобацилима. Чишћењем плаزمида из анализираних сојева недвосмислено је потврђена плазмидна локација гена за агрегационе факторе у два соја (BGNJ1-64 i BGSJ2-8). Конструкцијом и анализом плазмидних библиотека ова два соја изолован је клон који успешно доводи до поновне појаве агрегационог фенотипа хетерологог домаћина на основу чега је закључено да се на *SacI* фрагменту од 11, 4 килобаза налазе све неопходне генетичке информације за експресију агрегационог фенотипа. На основу поређења добијене секвенце *aggLb* гена са познатим генима установљено је да је откривен нови агрегациони фактор лактобацила. Закључено је да је AggLb протеин највећи до сада описани агрегациони фактор лактобацила од 318,6 kDa, који поседује велики број поновљених домена (6 хетерологих домена на Н-терминусу и 20 идентичних SpaB-like домена на Ц-терминусу). Установљено је да је AggLb агрегациони фактор одговоран за аутоагрегацију, везивање ћелија за колаген и фибронектин и последично за ексклузију патогена. Делетионом анализом појединих домена и конструкцијом великог броја варијанти AggLb протеина установљено је да су колаген везујући домени II, III i IV директно одговорни за везивање за колаген и фибронектини као и за индукцију аутоагрегације, док су SpaB-like домени највероватније одговорни за позиционирање колаген везујућих домена што даље од површине бактеријске ћелије. Делетијом појединих домена AggLb протеина агрегациони фактор губи функције агрегације и везивања за колаген и фибринектин, али даје способност ћелијама да формирају биофилм где је закључено да протеини могу да имају далеко већи потенцијал функција од оних које установимо у првим истраживањима.

У поглављу **Литература** дата је листа коју чини 197 библиографских јединица од којих је већина страних аутора. Наведене научне публикације су актуелне, и односе се на области које су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава, контекстуализује и потврђује добијене резултате. Списак литературе је адекватан, актуелан и довољно широк да покрива све аспекте истраживања и разматрана питања. Навођења литературе у самом тексту дисертације су јасна и примерена како по садржају тако и по месту.

3. БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из уже научне области:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. M21 - 1. 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* BGCG11. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1387-1396.

Impakt faktor IF- 3.952 (2013)

Oblast /Microbiology 24/119

Broj heterocitata: 2

2. M21 - **Miljkovic, M.**, Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, 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*. *PlosONE* (2015): e0126387.

Impakt faktor IF- 3.534 (2013)

Oblast / Multidisciplinary Sciences 8/55

Broj heterocitata: 2

- 3. M21** - Vukotic, G., Mirkovic, N., Jovicic, B., **Miljkovic, M.**, Strahinic, I., Fira, D., Radulovic, Z., Kojic, M. (2015). Proteinase PrtP impairs lactococcin LcnB activity in *Lactococcus lactis* BGMN1-501: new insights into bacteriocin regulation. *Frontiers in Microbiology*, 6.92.
Impakt faktor IF- 4.165 (2015)
Oblast / Microbiology 23/123
- 4. M21** - Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Begović, J., Filipić, B., Popović, D., Tolinački, M., **Miljkovic, M.**, Kojic, M., Golić, N. (2015). Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures?. *Frontiers in Microbiology*, 6.954
Impakt faktor IF- 4.165 (2015)
Oblast / Microbiology 23/123
- 5. M21** - Mirkovic, N., Polovic, N., Vukotic, G., Jovicic, B., **Miljkovic, M.**, Radulovic, Z., Diep, D.B., Kojic, M. (2016). *Lactococcus lactis* LMG2081 produces two bacteriocins: a non-lantibiotic and a novel lantibiotic. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(8):2555-62. doi: 10.1128/AEM.03988-15
Impakt faktor IF- 3.823 (2015)
Oblast /Microbiology 31/123
- 6. M21** - Zivkovic, M., **Miljković, M.**, Ruas-Madiedo, P., Markelic, M.B., Veljovic, K., Tolinacki, M., Sokovic, S., Korac, A., Golic, 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. *Frontiers in Microbiology*
Impakt faktor IF- 4.165 (2015)
Oblast / Microbiology 23/123
- 7. M21 - Miljkovic, M.**, Uzelac, G., Mirkovic, N., Devescovi, G., Diep, B.D., Venturi, V., Kojic, M. (2016). LsbB bacteriocin interacts with the third transmembrane domain of the YvjB receptor. *Applied and Environmental Microbiology* 15;82(17):5364-74. doi: 10.1128/AEM.01293-16.
Impakt faktor IF- 3.823 (2015)
Oblast /Microbiology 31/123
- 8. M21 - Miljković, M.**, Bertani, I., Fira, D., Jovčić, B., Novović, K., Venturi, V., Kojić, M. Shortening of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 AggLb protein switches its activity from auto-aggregation to biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2016.01422
Impakt faktor IF- 4.165 (2015)
Oblast / Microbiology 23/123
- 9. M22** - Hidalgo-Cantabrana, C., Nikolic, M., López, P., Suárez, A., **Miljkovic, M.**, Kojic, M., Golic, N., Ruas-Madiedo, P. (2014). Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue. *Anaerobe*, 26, 24-30.
Impakt faktor IF- 2.479 (2014)
Oblast / Microbiology 63/119
Broj heterocitata: 8
- 10. M22** - Uzelac, G., **Miljkovic, M.**, Lozo, J., Radulovic, Z., Tosic, N., Kojic, M. (2015). Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator. *Microbiological Research*, 179, 45-53.
Impakt faktor IF- 2.723 (2015)
Oblast / Microbiology 55/123
Broj heterocitata: 1

11. M22 - Stanisavljević, S., Lukić, J., Momčilović, M., **Miljković, M.**, Jevtić, B., Kojić, M., Golić, N., Mostarica Stojković, M., Miljković, D. (2016). Gut-associated lymphoid tissue, gut microbes and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis.

Beneficial Microbes. 7(3):363-73. doi: 10.3920/BM2015.0159

Impakt faktor IF- 3.301 (2015)

Oblast / Microbiology 41/123

12. M23 - Filipić, B., Jovčić, B., Uzelac, G., **Miljković, M.**, Antić-Stanković, J., Topisirović, L., Golić, N. (2013). Over-expressed CmbT multidrug resistance transporter improves the fitness of *Lactococcus lactis*. *Genetika*, 45(1), 197-206.

Impakt faktor IF-0.492 (2013)

Oblast / Genetics & Heredity 156/165

Broj heterocitata: 1

13. M23 - Uroić, K., Nikolić, M., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Lukić, J., Jovcic, B., Filipic, B., **Miljkovic, M.**, Golic, N., Caadez, N., Raspor, P., Suskovic J., Topisirović, L. (2014). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh soft cheese and Serbian white pickled cheese. *Food Technology and Biotechnology*, 52(2), 232-241.

Impakt faktor IF- 1.179 (2015)

Oblast / Food Science & Technology 69/124

Broj heterocitata: 4

14. M - Zivkovic, M., Cadez, N., Uroic, K., **Miljkovic, M.**, Tolinacki, M., Dousova, P., Kos, B., Suskovic, J., Raspor, P., Topisirovic, L., Golic, N. (2015). Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(1), 12-18.

Impakt faktor Na Kobsonu bez IF

Broj heterocitata: 1

2016.. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**

2. **M**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Nikolic M., Tolinacki, M., **Miljkovic, M.**, Filipic, B., Stankovic, J., Lukic, J., Begovic, J., Terzic-Vidojevic, A., Kojic, M., Golic, N., Topisirovic, L. (2012). Study of the probiotic potential of lactobacilli natural isolates through the analysis of adhesion ability to Caco-2 intestinal epithelial cell line. 6th Central European Congress on Food (CEFood 2012), I Food ingredients, health and nutrition, functional foods, Poster presentations, I P 103, Book of Abstracts, p. 163, Novi Sad, Serbia. **M34**

2. Golić, N., Nikolić, M., Lukić, J., Filipić, B., **Miljković, M.**, Tolinački, M., Terzić-Vidojević, A., Begović, J., Strahinić, I., Kojić, M. (2013). Uloga mikroorganizama u imunomodulaciji/The role of microbes in immunomodulation, Predavanje po pozivu štampano u celini, knjiga apstrakata – elektronski optički disk, ISBN 978-86-914897-1-7, IX kongres mikrobiologa Srbije, Beograd, Srbija. **M34**

3. Begovic, J., Lukic J., Strahinic I., **Miljkovic M.**, Milenkovic M., Jovcic B., Kojic M. (2014). Different roles of aggregation factors in adhesion to gastrointestinal mucosa. 5th Congress of Macedonian Microbiologists, Ohrid, Macedonia, Oral presentation, 28-31 May, Book of Abstracts, 10.4, p.88. **M34**

4. **Miljkovic, M.**, Strahinic, I., Tolinački, M., Nikolic, M., Begovic, J., Golic, N., Kojic, M. (2014). Cloning of novel lactobacilli aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, Book of Abstracts, p. 210. **M34**

5. Popovic, D., Golic, N., Veljovic, K., Begovic, J., Filipic, B., **Miljkovic, M.**, Kojic, M., Terzic-Vidojevic, A. (2014). Diversity and antibiotic susceptibility of enterococcal natural isolates from traditional dairy products of Western Balkan region. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, Book of Abstracts, p. 212. **M34**
6. Golic, N., Nikolic, M., Lukic, J., **Miljkovic, M.**, Filipic, B., Dinic, M., Vukotic, G., Kojic, M. (2014). Molecular mechanisms involved in health promoting potential of lactic acid bacteria. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, Book of Abstracts, p. 375. **M34**
7. Lukic, J., **Miljkovic, M.**, Tolinački, M., Nikolic, M., Begovic, J., Golic, N., Strahinic, I., Kojic, M. (2014). Probiotic potential of lactobacilli of different origins. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, Book of Abstracts, p. 380. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21 - Miljkovic, M.**, Strahinic, I., Tolinački, M., Zivkovic, 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*. *PlosONE* (2015): e0126387.
2. **M21 - Miljković, M.**, Bertani, I., Fira, D., Jovčić, B., Novović, K., Venturi, V., Kojić, M. Shortening of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 AggLb protein switches its activity from auto-aggregation to biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2016.01422

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Begovic, J., Lukic J., Strahinic I., **Miljkovic M.**, Milenkovic M., Jovcic B., Kojic M. (2014). Different roles of aggregation factors in adhesion to gastrointestinal mucosa. 5th Congress of Macedonian Microbiologists, Ohrid, Macedonia, Oral presentation, 28-31 May, Book of Abstracts, 10.4, p.88. **M34**
2. **Miljkovic, M.**, Strahinic, I., Tolinački, M., Nikolic, M., Begovic, J., Golic, N., Kojic, M. (2014). Cloning of novel lactobacilli aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, Book of Abstracts, p. 210. **M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

4. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата **Марије С. Миљковић**, под насловом „Карактеризација AggLb агрегационог фактора соја *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64“ представља оригиналан научни рад са јасно формулисаним циљевима заснованим на добром познавању научне проблематике, са адекватно планираним и успешно реализованим истраживачким поступком чији резултати

представљају оригинални научни допринос разумевању природе, структуре и функције једног новог агрегационог фактора лактобацила.

Тема докторске дисертације је изузетно актуелна, можемо рећи да је кандидаткиња један од пионира у датој области. На самом почетку кандидаткиња је систематски проучила доступне резултате других аутора, добро дефинисала предмет и програм истраживања, поставила исправне циљеве, затим је одабрала адекватну методологију за остварење задатих циљева где су уведени, по први пут у свету, нови приступи решавању постављених задатака. У изради дисертације Марија С. Миљковић је показала изузетну иницијативу током целокупног периода израде докторске тезе и показала висок степен самосталности како у експерименталном раду тако и при тумачењу добијених резултата које је критички дискутовала, уз исцрпне податке из литературе. Треба нагласити да су остварени резултати објављени у врхунским међународним часописима, што потврђује актуелност резултата и да је кандидаткиња, у сарадњи са менторима, пажљиво одабрала тему истраживања, која је тек отворена на светском нивоу тако да и у наредном периоду може бити успешно развијана и продубљивана.

На основу увида у експериментални рад током самог истраживања, постигнуте резултате као и написану докторску тезу, Комисија закључује да су задаци постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, испуњени у потпуности, тако да позитивно оцењује докторску тезу и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Марије С. Миљковић**, под насловом **Карактеризација AggLb агрегационог фактора соја *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64** “ и омогући кандидату јавну одбрану рада.

У Београду, 06. 09. 2016. године.

КОМИСИЈА:

др Милан Којић, научни саветник
Института за молекуларну генетику
и генетичко инжењерство Универзитета у Београду

др Бранко Јовчић, ванредни професор
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Јелена Лозо, ванредни професор
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Милорад Којић, научни саветник
Института за молекуларну генетику
и генетичко инжењерство Универзитета у Београду
