

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/105



## ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	J3-4259
<b>Naslov projekta</b>	Priprava in validacija terapevtskih plazmidov brez selekcijskega gena za antibiotično rezistenco za gensko terapijo raka z inducibilnimi in tkivno specifičnimi promotorji
<b>Vodja projekta</b>	14575 Maja Čemažar
<b>Tip projekta</b>	J Temeljni projekt
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	7560
<b>Cenovni razred</b>	C
<b>Trajanje projekta</b>	07.2011 - 06.2014
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	2413 Univerza na Primorskem Fakulteta za vede o zdravju
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	105 Nacionalni inštitut za biologijo 302 ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA 481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	3 MEDICINA 3.04 Onkologija
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	13.03 Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)
<b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>	3 Medicinske vede 3.01 Temeljna medicina

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

#### 2. Povzetek raziskovalnega projekta<sup>1</sup>

SLO

Eno izmed glavnih ovir pri uporabi genske terapije raka v kliničnih študijah predstavlja razvoj varnega in učinkovitega sistema, ki bo zagotovil selektivno ciljanje tumorskih celic z minimalnimi poškodbami normalnega tkiva. Čeprav se virusni vektorji večinoma uporabljajo

zaradi visoke stopnje transfekcije, lahko v določenih okoliščinah izzovejo hude stranske učinke pri zdravljenih pacientih. Plazmidna DNA trenutno predstavlja edino alternativo virusnim vektorjem, vendar njeno uporabo v genski terapiji omejuje prisotnost gena za odpornost proti antibiotikom. Ta lahko sproži aktivacijo imunskega sistema ter predstavlja tveganje za horizontalni prenos v naravno prisotne bakterije v telesu. Drugi dejavniki, ki jih je potrebno upoštevati pri razvoju genske terapije, so izbira terapevtskega gena, uravnavanje njegovega izražanja in način vnosa. Cilj projekta je bil razvoj varnejšega in učinkovitejšega sistema za prenos genov v tarčne celice s pripravo plazmidne DNA brez gena za odpornost proti antibiotikom in z uravnavanim izražanjem terapevtskega gena z njegovo vezavo na inducibilne in tkivno specifične promotorje. Poleg tega smo določevali tudi možnost horizontalnega genskega prenosa med rekombinantnimi plazmidi, transgenimi bakterijami in bakterijami naravno prisotnimi v organizmu. Naša hipoteza je bila, da so plazmidi, ki kodirajo terapevtske gene pod kontrolo tkivno specifičnih in inducibilnih promotorjev in so brez gena za odpornost proti antibiotikom, varni vektorji z uravnanim izražanjem za uporabo v genski terapiji. Za pripravo rekombinantnih plazmidov, ki kodirajo reporterski ali terapevtski gen pod kontrolo tkivno specifičnih in inducibilnih promotorjev smo uporabili standardne molekularno-biološke metode restrikcije in ligacije. Za pripravo plazmidov brez gena za odpornost proti antibiotikom smo uporabili tehnologijo operator-represorske titracije (ORT) v kombinaciji s standardnimi molekularno-biološkimi metodami restrikcije in ligacije. Horizontalni genski prenos smo določevali z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in ostalimi standardnimi laboratorijskimi postopki. Učinek pripravljenih plazmidov na delovanje celičnih kultur smo spremljali s testom proliferacije, angiogeneze in s testom za določevanje metastatskega potenciala. Na tumorskih modelih *in vivo* smo določevali protitumorski učinek pripravljenih plazmidov s testom zaostanka v rasti tumorjev. Poleg tega smo opravili tudi histološko analizo tumorjev. Projekt se je izvajal v vseh sodelujočih laboratorijih, kjer je bila za izvajanje eksperimentalnega dela zagotovljena vsa potrebna raziskovalna oprema.

ANG

One of the main goals of cancer gene therapy is the development of vectors which will ensure selective and controlled expression of therapeutic genes in the targeted cells with minimal damage of normal tissue. Although viral vectors are most frequently used because of their high transfection efficacy, they can cause different side effects in treated patients. Plasmid DNA currently represents the only alternative for the viral vectors but its use in gene therapy is limited because of the presence of antibiotic resistance gene. This can provoke the activation of immune response and can be transferred into bacteria naturally present in the body. Other factors that should be considered for development of gene therapy are the choice of therapeutic gene, regulation of its expression and administration route. In the project, we addressed safety of plasmid DNA by preparation of plasmid DNA without the antibiotic resistance gene and regulation of therapeutic gene expression by linking them to the inducible and tissue specific promoters. Additionally, possible horizontal gene transfer between recombinant plasmid DNA or transformed transgenic bacteria and commensal naturally occurring bacteria were determined. Our hypothesis was that prepared plasmids encoding therapeutic genes under the control of tissue specific and inducible promoters without the antibiotic resistance gene are safe vectors for gene therapy with also regulated expression. Recombinant plasmids encoding reporter or therapeutic gene under the control of tissue specific and inducible promoters were prepared by using standard molecular-biological methods of restriction and ligation. For the preparation of plasmids without the antibiotic resistance gene, operator-repressor titration technology (ORT) was used in combination with standard molecular-biological methods of restriction and ligation. To evaluate horizontal gene transfer, PCR assays and other standard laboratory procedures were used. For determination of the effect of prepared plasmids on cell in cultures, standard test for proliferation, antiangiogenic and antimetastatic potential were used. Antitumor effectiveness was determined on tumor models *in vivo* by tumor growth delay assay. In addition, histological analysis of tumors was also performed. The experiments were performed at the laboratories of partners participating in the project.

### 3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>2</sup>

Glavni cilj projekta je bil pripraviti in ovrednotiti terapevtske plazmide brez gena za odpornost

proti antibiotikom s tkivno specifičnimi ali inducibilnimi promotorji, ki bodo uravnavali izražanje terapevtskih genov, kot so IL-12, shRNA proti CD105 in CD146. Za doseg cilja je bil projekt razdeljen v več delovnih sklopov (DS).

DS 1: V prvem delovnem sklopu smo najprej pridobili promotorje, ki smo jih izbrali v sodelovanju s partnerji vključenimi v projekt. Od tkivno specifičnih promotorjev smo v projekt vključili promotor gena za endotelin-1, ki cilja endotelijske celice v tumorju,  $\gamma$ -aktin, ki cilja celice gladkega mišičja v žilni steni in kolagen tipa I, ki cilja fibroblasti kože. Promotor gena za CDKN1A (p21 promotor), ki je občutljiv senzor genotoksičnosti, smo izbrali za inducibilni promotor. Nato smo pripravili plazmide z zapisom za dva reporterska gena, zeleno fluorescirajočim proteinom (GFP) in rdeče fluorescirajočim proteinom (DsRed), katerih izražanje je bilo uravnano z izbranimi tkivno specifičnimi in inducibilnim promotorji. Na osnovi naših predhodnih poskusov z interlevkinom 12 (IL-12) in malo interferenčno RNA molekulo proti endoglinu (siRNA proti CD105) smo pripravili plazmide s tema terapevtskima molekulama pod kontrolo izbranih tkivno specifičnih promotorjev in inducibilnega promotorja. Rekombinantne plazmide smo pripravili s standardnimi molekularno-biološkimi metodami restrikcije in ligacije. V okviru 3. naloge za pripravo terapevtskega plazmida z mišjim IL-12 pod kontrolo promotorja za  $\gamma$ -aktin, nismo mogli uporabiti standardno restrikcijsko kloniranje, ker v izvornih plazmidih ni bilo ustreznih restrikcijskih mest. Zato smo za pripravo tega plazmida promotor  $\gamma$ -aktina z ustreznimi restrikcijskimi mesti naročili pri proizvajalcu Life Technologies preko storitve GeneArt® Strings™ DNA Fragments. Uspešnost priprave vseh reporterskih in terapevtskih plazmidov smo potrdili z restrikcijsko analizo.

DS 2: Uspešno smo zaključili tudi delo na drugem delovnem sklopu, v katerem smo testirali prenos plazmidne DNA, ki jo uporabljamo v veterinarski onkologiji za zdravljenje predvsem mastocitomov pri psih, v bakterije, ki so naravno prisotne na koži psov v okolici tumorja. Plazmidna DNA, ki jo uporabljamo za zdravljenje tumorjev psov, vsebuje poleg terapevtskega gena za IL-12, tudi gen za odpornost proti antibiotikom. Testirali smo prenos v *in vitro* razmerah, torej smo izvajali transformacijo na predhodno pripravljenih kompetentnih bakterijah in ugotovili, da se plazmid v tako pripravljene bakterije lahko prenese samo v *Escherichia coli* (*E. coli*), ki je tudi gostiteljska bakterija za namnožitev plazmida v laboratorijskih razmerah torej je bil to pričakovan rezultatov. V ostale bakterije, ki smo jih izolirali na koži psov pa se plazmidna DNA ni prenesla, niti v *in vitro* pogojih.

DS 3: Plazmide, ki smo jih naredili v DS1 smo dodatno obdelali oziroma smo jih pripravili brez gena za odpornost proti antibiotikom. Uspešno smo pripravili plazmide, ki kodirajo terapevtsko molekulo IL-12 in/ali shRNA proti CD105 pod kontrolo izbranih tkivno specifičnih promotorjev in inducibilnega promotorja brez gena za odpornost proti antibiotikom. V ta namen smo uporabili dve komplementarni tehnologiji X-mark™ in ORT®, ki smo ju dobili za uporabo v akademske namene od podjetja Cobra Biomanufacturing PLC (Oxford, UK), v kombinaciji s standardnim molekularnim kloniranjem. Uspešnost priprave vseh reporterskih in terapevtskih plazmidov smo potrdili z restrikcijsko analizo.

DS 4: V četrtem delovnem sklopu smo validirali tkivno specifičnost in inducibilnost pripravljenih reporterskih plazmidov, ki smo jih pripravili v DS1. Primerjali smo učinkovitost transfekcije pripravljenih reporterskih plazmidov, katerih izražanje je uravnano z izbranimi tkivno specifičnimi promotorji in inducibilnim promotorjem, z učinkovitostjo transfekcije izvornega reporterskega plazmida s konstitutivnim virusnim promotorjem. S sledenjem izražanja reporterskega gena s fluorescentnim mikroskopom in pretočnim citometrom na različnih celičnih linijah smo pokazali, da je izražanje najvišje pri tarčnih celicah, ki so specifične za izbrane tkivne promotorje. Prav tako smo dokazali inducibilnost izbranega p21 promotorja z genotoksičnim stresom po obsevanju in tretiranju s cisplatinom. Z rezultati pretočne citometrije smo pokazali, da tkivno specifični in inducibilni promotorji vodijo sicer slabše izražanje reporterskih genov v primerjavi s konstitutivnim virusnim promotorjem, ampak je izražanje bolj specifično in kontrolirano.

DS 5: Terapevtske plazmide s tkivno specifičnimi promotorji brez in z genom za odpornost proti antibiotikom smo validirali *in vitro*. Za transfekcijo smo uporabili nevirusni dostavni sistem elektroporacijo. Terapevtski učinek plazmida, ki kodira shRNA proti CD105, katere izražanje je pod kontrolo promotorja za endotelin-1, smo ovrednotili s funkcionalnimi testi proliferacije, angiogeneze in s testom za določevanje metastatskega potenciala. Promotor za endotelin-1 je vodil uspešno izražanje shRNA antiCD105, tako kot konstitutivni promotor U6, kar je posledično utišalo izražanje CD105 in zmanjšalo proliferacijo, migracijo, invazijo in sposobnost tvorbe kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic. Terapevtski učinek

plazmidov, ki kodirajo IL-12 pod kontrolo promotorja za  $\gamma$ -aktin in promotorja za kolagen tipa I, smo ovrednotili z določevanjem ravni mRNA in izražanjem proteina. Za določevanje mRNA smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR), za merjenje koncentracije proteina pa encimsko imunski test (ELISA). Povečano izražanje IL-12, ki je bilo uravnano s promotorjem za  $\gamma$ -aktin in promotorjem za kolagen tipa I nismo uspeli dokazati v tarčnih celicah na ravni mRNA, smo pa jo dokazali na ravni koncentracije izraženega proteina za IL-12. Vsi terapevtski plazmidi brez gena za odpornost na antibiotike so se izkazali za enako učinkovite kot terapevtski plazmidi z genom za odpornost na antibiotike.

DS 6: V šestem delovnem sklopu smo ocenili terapevtski učinek validiranih plazmidov iz DS 5 v *in vivo* poskusih na modelu mišjega melanoma in adenokarcinoma. Protitumorski učinek terapevtskih plazmidov smo določali s spremljanjem zaostanka v rasti tumorjev, protimetastatski učinek pa z neinvazivno metodo bioluminiscenčnega slikanja. Poleg tega smo s histološko analizo določili prisotnosti nekroze in krvnih žil v tumorjih. Za transfekcijo smo uporabili nevirusni dostavni sistem elektroporacijo. Utišanje izražanja CD105, posredovano s plazmidom, ki nosi zapis za molekulo shRNA proti CD105 pod kontrolo promotorja za endotelin-1 z genom za odpornost proti antibiotikom, je imelo protitumorski in protimetastatski učinek na modelu mišjega melanoma. Zdravljenje tumorjev z istim plazmidom je zmanjšalo število krvnih žil v tumorju in povečalo delež nekroze. Prav tako smo protitumorsko in protimetastatsko učinkovitost dokazali tudi s plazmidom, ki nosi zapis za shRNA proti CD105 pod kontrolo promotorja za endotelin-1 in je brez gena za odpornost proti antibiotikom. Poleg tega smo dokazali protitumorski učinek tudi s plazmidom, ki nosi zapis za IL-12 pod kontrolo inducibilnega promotorja p21 na modelu mišjega adenokarcinoma.

#### 4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

Raziskovalne cilje, zastavljene znotraj vseh delovnih sklopov, smo realizirali v času trajanja projekta. Zastavljeno hipotezo smo potrdili, saj smo uspešno pripravili terapevtske plazmide s tkivno specifičnimi promotorji brez gena za odpornost proti antibiotikom. Z uporabo tkivno specifičnih promotorjev smo dosegli selektivno ciljanje tarčnih celic. Terapevtski učinek pripravljenih plazmidov smo pokazali *in vitro* kot tudi *in vivo*.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>4</sup>

Odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta ni bilo.

#### 6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>5</sup>

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	1366651	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Celični biosenzorski sistem z rdečim fluorescentnim proteinom za detekcijo genetskih poškodb povzročenih z ionizirajočim sevanjem
		ANG	Cell-based biosensor system for the detection of radiation-induced genetic damage using red fluorescent protein
			Testi za merjenje poškodb DNK po obsevanju z ionizirajočim sevanjem in testi genotoksičnosti kemikalij in farmacevtskih proizvodov, pesticidov, aditivov ter kozmetičnih proizvodov so pomembni za ocenitev zdravstvenih tveganj in so tudi zakonsko predpisani. Razvili smo nov test genotoksičnosti oz. celični biosenzorski sistem, ki temelji na stabilno transformirani celični liniji raka jeter HepG2 z reporterskim genom DsRED, katerega izražanje je pod kontrolo p21 promotorja. Delovanje in občutljivost našega

	Opis	SLO	biosenzorskega sistema za odkrivanje poškodb DNK smo ovrednotili z genotoksičnimi agensi z znanim mehanizmom delovanja, kot so ionizirajoče sevanje in kemijski agensi cisplatin, metilmetansulfonat (MMS), benzo(a) piren (BaP) in vinblastin(VLB). Preliminarni rezultati so pokazali, da obsevanje in ostali testirani agensi povzročijo dozno odvisno indukcijo v fluorescenci. S temi rezultati smo pokazali, da je naš novi test uporaben kot hiter in preprost biosenzorski sistem za odkrivanje genetskih napak.	
		ANG	Tests for measuring DNA damage following exposure to ionising radiation and genotoxicity testing of chemicals and products such as pharmaceuticals, pesticides, food additives, and cosmetics are important for the assessment of health hazard and are also regulatory requirements. We developed a new genotoxicity test – a cell-based biosensor system - based on a p21 promoter-dependent DsRED reporter gene assay with stably transformed human hepatoma HepG2 cells. The performance and sensitivity of our cell-based biosensor system for the detection of DNA damage has been evaluated with genotoxic agents with known mechanisms of action, such as radiation and chemical agents cisplatin, methyl methanesulphonate (MMS), benzo(a)pyrene (BaP) and vinblastine (VLB). Our preliminary results show that radiation, as well as all tested agents, induces the increase in DsRED fluorescence above a certain dose (concentration) in a dose-dependent manner. Based on the results, we demonstrated that this novel assay can be used as a fast and simple biosensor system for the detection of genetic damage	
	Objavljeno v	Nato Science & Technology Organization; Biological effects of ionizing radiation exposure and countermeasures; 2012; Str. 7-1-7-8; Avtorji / Authors: Čemažar Maja, Filipič Metka, Žager Valerija, Blagus Tanja, Žegura Bojana, Hreljac Irena, Kamenšek Urška, Serša Gregor		
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci		
2.	COBISS ID	512362809	Vir: COBISS.SI	
	Naslov	SLO	In vitro ciljanje endotelijskih celic s promotorjem za humani endotelin-1 vsebujočo plazmidno DNA	
		ANG	In vitro targeted gene electrotransfer to endothelial cells with plasmid DNA containing human endothelin-1 promoter	
	Opis	SLO	Enega izmed novih pristopov za gensko zdravljenje raka predstavlja razvoj vektorjev, ki bodo zagotovili izražanje transgena v točno določenem tipu celic. Članek opisuje uspešno pripravo plazmide DNA, ki vsebuje reporterski gen za zeleno fluorescirajoči protein (GFP) katerega izražanje je pod kontrolo promotorja za humani endotelin-1 (pENDO-EGFP). Izražanje reporterskega gena za GFP je bilo bistveno višje v tarčnih, za promotor specifičnih endotelijskih celicah v primerjavi z kontrolnimi ne endotelijskimi celicami. Izboljšano izražanje reporterskega gena za GFP je bilo doseženo po optimizaciji pogojev elektrogenskega prenosa v endotelijske celice. Dobljeni rezultati lahko pomagajo pri pripravi terapevtske plazmidne DNA, ki bi bila primerna za antiangiogeno gensko terapijo raka.	
		ANG	One of the new approaches for cancer gene therapy represent development of vectors which will ensure the expression of transgene into the specific cell types. Article represents preparation of plasmid DNA encoding green fluorescent protein (GFP) under the control of human endothelin-1 promoter (pENDO-EGFP). Significantly higher expression of GFP was observed in endothelial cells, which were specific for promoter compared to non-endothelial cells. Improved transfection efficacy of pENDO-EGFP into endothelial cells was reached after optimization of gene electrotransfer parameters. Based on these results we can prepare therapeutic plasmid DNA which could be appropriate for antiangiogenic cancer gene therapy.	
			Springer; The journal of membrane biology; 2013; Vol. 246, no. 10; str.	

	Objavljeno v	783-791; Impact Factor: 2.174; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.903; WoS: CQ, DR, UM; Avtorji / Authors: Tešić Nataša, Čemažar Maja	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	1643131	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Ocena primernosti p21 promotorja za z obsevanjem inducirano transkripcijsko ciljanje na mišjem tumorskem modelu
		ANG	Evaluation of p21 promoter for interleukin 12 radiation induced transcriptional targeting in a mouse tumor model
	Opis	SLO	Namen raziskave je bil oceniti primernost p21 promotorja za z obsevanjem inducirano transkripcijsko ciljanje s končnim ciljem testirati terapevtsko učinkovitost kombinirane radio-genske terapije s terapevtskim genom za interleukin 12 pod kontrolo p21 promotorja. Z uporabo reporterskih eksperimentalnih modelov smo dokazali, da se p21 promotor inducira z obsevanjem, da indukcija ni odvisna od doze in da ga lahko ponovno induciramo. Radio-genska terapija z interleukinom 12 pod kontrolo p21 promotorja je imela dober protitumorski učinek s statistično značilnim zaostankom v rasti tumorjev, ki je bil primerljiv s tistim po terapiji s konstitutivnim promotorjem. S to raziskavo smo dokazali, da je p21 promotor primeren kandidat za transkripcijsko ciljanje. Radio-genske terapije z radio-inducibilnim interleukinom 12 je imela sinergistični protitumorski učinek v primerjavi s samo radioterapijo, s čimer smo potrdili terapevtska vrednost tega plazmida in dokazali njegovo uporabnost v kombinaciji z radioterapijo.
		ANG	The aim of the study was to evaluate the suitability of the p21 promoter for radiation induced transcriptional targeting with the objective to test the therapeutic effectiveness of the combined radio-gene therapy with p21 promoter driven therapeutic gene interleukin 12. Using the reporter gene experimental models, p21 promoter was proven to be inducible with radiation, the induction was not dose dependent, and it could be re-induced. Furthermore radio-gene therapy with interleukin 12 under control of the p21 promoter had a good antitumor therapeutic effect with the statistically relevant tumor growth delay, which was comparable to that of the same therapy using a constitutive promoter. In this study p21 promoter was proven to be a suitable candidate for radiation induced transcriptional targeting. As a proof of principle the therapeutic value was demonstrated with the radio-inducible interleukin 12 plasmid providing a synergistic antitumor effect to radiotherapy alone, which makes this approach feasible for the combined treatment with radiotherapy.
	Objavljeno v	BioMed Central; Molecular cancer; 2013; Vol. 12, no. 136; str. [1-12]; Impact Factor: 5.397; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 4.412; A': 1; WoS: CQ, DM; Avtorji / Authors: Kamenšek Urška, Serša Gregor, Čemažar Maja	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	1687675	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Sprememba orientacije elektrode, ne pa polarnosti pulzov, poveča učinkovitost genskega elektrotransfera v tumorje in vivo
		ANG	Changing electrode orientation, but not pulse polarity, increases the efficacy of gene electrotransfer to tumors in vivo
			V nasprotju z obširnimi in vitro raziskavami, ki so pokazale povečan genski elektrotransfer po spremembi smeri električnega polja, je zelo malo znano o učinkovitosti pulzov z dvojno polarnostjo in vivo. Namen naše raziskave je bil ovrednotiti učinek polarnosti pulzov in orientacije na uspešnost genskega elektrotransfera na tumorskem modelu mišjega fibrosarkoma z

	Opis	SLO	reporterskima plazmidoma, ki kodirata luciferazo in GFP. Naši rezultati so pokazali, da ni razlik pri aktivnosti luciferaze, z GFP transfeciranim področju ali intenziteti fluorescence med različnimi seti električnih pulzov. Inverzija polarnosti pulzov ni povečala genskega prenosa, nesignifikantno povečanje do 7-krat pa smo opazili po spremembi orientacije električnega polja pravokotno glede na začetno orientacijo. Opazili smo tudi transfekcijo okoliškega tkiva, kar pomeni, da ima lahko intratumorski genski elektroprenos sistemski učinek. Naši rezultati kažejo, da testirane modifikacije električnih pulzov niso signifikantno spremenile učinkovitosti genskega elektroprenosa v tumorjev LPB. Biološki dejavniki, kot je sestava tkiva, imajo lahko večji pomen in jih je potrebno upoštevati pri izboru parametrov električnih pulzov za specifična tkiva.
		ANG	Contrary to extensive in vitro studies demonstrating increased gene electrotransfer by changing the electric field direction during the pulse delivery, little is known about the efficiency of both polarities pulses in vivo. Therefore the aim of our study was to evaluate the effect of pulse polarity and orientation on the efficacy of gene electrotransfer in the murine fibrosarcoma tumor model by using the luciferase and GFP reporter gene expression plasmids. Our results demonstrated no significant difference in luciferase activity, GFP transfected area or fluorescence intensity between different sets of electric pulses. Inversion of the pulse polarity did not result in the increase of gene transfer, but non-significant enhancement up to 7-fold was detected by changing the electric field orientation in perpendicular direction. Also, transfection of surrounding skin tissue was observed, meaning that intratumoral gene electrotransfer could also result in a systemic effect. Our data indicate that tested modifications of electric pulses are not significantly affecting the efficiency of gene electrotransfer to LPB tumors. Biological factors, like tissue composition, might be of greater importance and should therefore also be taken into account when selecting the electric pulse parameters for specific tissues.
	Objavljeno v	Elsevier; Bio-Electroporation; Bioelectrochemistry; 2014; Str. 119-127; Impact Factor: 3.870; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.118; A': 1; WoS: CQ, CU, DA, HQ; Avtorji / Authors: Todorović Vesna, Kamenšek Urška, Serša Gregor, Čemažar Maja	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	1852795	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Inhibitorji endocitoze ovirajo prenos genov z elektroporacijo v mišico miši in vivo
		ANG	Inhibitor of endocytosis impairs gene electrotransfer to mouse muscle in vivo
	Opis	SLO	Aplikacija električnih pulzov je učinkovita metoda dostave genov in vivo in in vitro. Mehanizmi vstopa DNA v celico še niso razumljivi. Vedno več je eksperimentalnih dokazov, da DNA vstopi v celico z endocitozo. Namen študije je bil pojasniti ali inhibitorji endocitoze, metil- $\beta$ -ciklodekstrin (M $\beta$ CD), konkavalin in dinazor, ovirajo transfekcijsko učinkovitost genske elektroterapije (GET) in vitro na B16F1 mišjem melanomu in in vivo na m. tibialis cranialis pri miših. Študija je pokazala, da M $\beta$ CD, generalnih inhibitor endocitoze, skoraj prepreči vstop plazmida v celico in vitro. ConA, inhibitor s klatrini posredovane endocitoze, ravnotako prepreči vstop plazmida v celico, a v manjšem obsegu. Dinazor, reverzni inhibitor dinamina, pa ne vpliva na učinkovanje GET. M $\beta$ CD je zmanjšal učinkovanje GET in vivo in učinek je bil dolgotrajen.
			Application of electric pulses is an effective method for gene transfer in vitro and in vivo. Currently, the mechanism by which the DNA enters the cell are not yet fully understood. Experimental evidence is building up that endocytosis is the main mechanism by which the DNA, which is later

	ANG	expressed, enters the cell. The aim of the study was to elucidate whether inhibitors of endocytosis impair transfection efficacy of GET in vitro in B16F1 murine melanoma and in vivo in m. Tibialis cranialis in mice. We show that methyl- $\beta$ -cyclodextrin- general inhibitor of endocytosis- can almost prevent GET of EGFP-N1 plasmid in vitro, that Concanavalin A- inhibitor clathrin mediated endocytosis- also abrogates GET but to lesser extent, and when using Dynasore- reversible inhibitor of dynamin- there is no effect on GET efficacy. The result of this study shows that endocytosis is probably the main mechanism of entrance of DNA in vitro and also in vivo.
Objavljeno v		Elsevier; Bioelectrochemistry; 2014; Vol. , no.; str. [1-9]; Impact Factor: 3.870; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.118; A': 1; WoS: CQ, CU, DA, HQ; Avtorji / Authors: Markelc Boštjan, Skvarča Eva, Dolinšek Tanja, Kloboves-Prevodnik Veronika, Čör Andrej, Serša Gregor, Čemažar Maja
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

### 7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	31328729 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Antiangiogeni in protitumorski učinek genske terapije s kratkimi nekodirajočimi molekulami RNA proti endoglinu na mišjih tumorskih modelih
		ANG Antiangiogenic and antitumor effect of gene therapy with short noncoding RNA molecules against endoglin in murine tumor models.
	Opis	SLO Prof. Maja Čemažar je bila mentorica mladi raziskovalki Tanji Dolinšek, ki je v letu 2014 uspešno zagovarjala doktorsko nalogo z naslovom Antiangiogeni in protitumorski učinek genske terapije s kratkimi nekodirajočimi molekulami RNA proti endoglinu na mišjih tumorskih modelih.
		ANG Prof. Maja Cemazar was a supervisor of PhD thesis of young researcher Tanja Dolinsek. In 2014, Tanja Dolinsek successfully defended her PhD thesis entitled Antiangiogenic and antitumor effect of gene therapy with short noncoding RNA molecules against endoglin in murine tumor models.
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v	[T. Dolinšek]; 2014; XIV, 85 f.; Avtorji / Authors: Dolinšek Tanja
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija
2.	COBISS ID	1811067 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Ne invazivno slikanja fluorescence za sledenje aktivnosti promotorjev in vivo
		ANG Non-invasive fluorescence imaging for monitoring promoter activity in vivo
	Opis	SLO V vabljenem predavanju smo predstavili metodo ne invazivnega slikanja fluorescence z vidika zaščite živali in njeno uporabnost v poskusih genske terapije. In vivo slikanje predstavlja uporabno orodje za dolgotrajno sledenje dinamičnih bioloških procesov, ki ne zahteva invazivnih postopkov na živalih. V poskusih genske terapije lahko metodo uporabimo za in vivo sledenje izražanja reporterskih genov in posredno tudi aktivnosti promotorjev, ki kontrolirajo njihovo izražanje. Uporabo metode smo v predavanju predstavili na primeru študije aktivnosti promotorja CMV. V tej raziskavi smo dokazali, da je neinvazivnega slikanja fluorescence resnično primerna metoda za sledenje aktivnosti promotorjev in vivo, ki tudi



		zadostuje osnovnemu etičnemu načelu poskusov na živalih, načelu teh R (zamenjava, zmanjšanje in izboljšanje).	
	ANG	In the invited lecture a method of non-invasive fluorescence imaging and its usability in gene therapy experiments was presented from the animal welfare point of view. In vivo imaging techniques represent exciting opportunity to conduct noninvasive and longitudinal long-term studies of dynamic biological processes. In gene therapy experiments non-invasive fluorescence imaging can be employed for following transgene expression in vivo and indirectly also the activity of promoters that drive their expression. In the lecture an example of CMV promoter activity study was used to show how the method can be used in gene therapy experiments. In the mentioned study we demonstrated that non-invasive fluorescence imaging is indeed an appropriate and convenient method to monitor the activity of the promoter in vivo which also promotes the principal ethical code of animal experiments, that is of 3Rs (replacement, reduction refinement).	
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
	Objavljeno v	Veterinarska fakulteta; Proceedings; 2014; Str. 24; Avtorji / Authors: Kamenšek Urška, Serša Gregor, Čemažar Maja	
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)	
3.	COBISS ID	3667066	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Elektrogenska terapija pasjih tumorjev z interlevkinom 12: ocena tveganja prenosa gena za odpornost proti ampicilinu
		ANG	Cancer electrogene therapy with interleukin-12 in dogs: risk assessment of ampicillin resistance gene transfer
	Opis	SLO	Za razliko od virusnih vektorjev, nevirusni vektorji imajo več prednosti kot so varnost, nižja toksičnost in lažja priprava. Gen za odpornost proti antibiotikom je sestavni del terapevtskih plazmidov in omogoča selekcijo rekombinantnih plazmidov in njihovo namnožitev v gostiteljevem sevu. Zaradi globalnega širjenja bakterij odpornih proti antibiotikom v zadnjih dveh desetletjih, je zdravljenje nekaterih humanih in živalskih bolezni postalo težavno. Da bi se preprečil horizontalni prenos gena za odpornost proti antibiotikom, zdravstvene oblasti priporočajo uporabo vektorjev genski terapiji brez tega gena. Cilj študije je bil ugotoviti (1) ali lahko gen za odpornost proti ampicilinu v plazmidu pORF-hIL12, ki je bil uporabljen za elektrogensko zdravljenje mastocitov (MCT) pri psih, zaznamo dva in sedem dni po terapiji v kožni mikrobioti psov ter (2) raziskati kožno mikrobioto psov pred terapijo z namenom, da bi ocenili učinkovitost transformacije bakterij s plazmidom pORF-hIL12 in vitro. V študijo je bilo vključenih 6 psov s kožnimi in podkožnimi MCT, ki so bili zdravljeni z intratumorskim genskim elektroprenosom (EGT). Vzorci brisov, odvzetih takoj pred terapijo in dva ter sedem dni po terapiji, so bili nacepljeni na standardna gojišča. DNA je bila izolirana s pomočjo DNA izolacijskih kitov. Prisotnost gena za odpornost proti ampicilinu in/ali gena za hIL12 je bila ugotovljena s PCR z uporabo različnih oligonukleotidov in protokolov. Elektroporacija je bila uporabljena za in vitro transformacijo bakterij. Pri nobenem od šestih psov niso bile prisotne bakterije, ki vsebujejo gen za odpornost proti ampicilinu ali katerikoli drugi gen iz plazmida pORF-hIL12. In vitro transformacija bakterij s plazmidom pORF-hIL12 izoliranih s kože psov je bila neuspešna pri večini testiranih izolatov. Samo kompetentni sevi E.coli in Klebsiella sp. se lahko transformirajo v in vitro pogojih. Naši rezultati kažejo, da je horizontalni prenos gena za odpornost proti ampicilinu iz plazmida pORF-hIL12 v bakterije naravno prisotne na koži psov malo verjetno zaradi nezmožnosti uspešne transformacije in/ali replikacije plazmida v bakterijskih celicah gostitelja.

		<p>In comparison to gene delivery with viral vectors »nonviral« gene delivery approaches offer several advantages, including safety, lower toxicity and easier preparation. Selective marker genes coding for antibiotic resistance have been an essential part of therapeutic plasmids, allowing selection of recombinant plasmids and retention in the bacterial host strain during large scale amplification. Due to the global spread of antibiotic resistant bacteria in the last two decades which makes it difficult to treat certain human and animal infections, health authorities recommend the ban of resistance genes for the construction of gene therapy vectors in order to prevent horizontal gene transfer of the resistance genes. The aim of the study was (1) to find out whether the ampicilin resistance gene from plasmid pORF-hIL12, which was used for electrogene therapy of mast cell tumors (MCT) in dogs, could be detected two and seven days after the treatment in the dog skin microbiota and (2) survey of dog skin microbiota before treatment in order to estimate the transformation efficiency of identified bacterial species with pORF-hIL12 in vitro. The study included 6 dogs with cutaneous or subcutaneous MCT, treated with intratumoral EGT. Swab samples taken from dog skin immediately before gene therapy and after 2 and 7 days were cultured on standard media. DNA was extracted from bacterial cells by the boiling method or with DNA extraction kits. The ampiciline resistance gene and/or hIL12 gene were detected by PCR using different primers and protocols. Electroporation according to bacterial species protocols, where available, was used for in vitro transformation experiments. In none of the six treated patients, bacteria containing ampicilin or any other gene from plasmid pORF-hIL12 were detected after culturing. In vitro transformation of pORF-hIL12 into untreated and competent bacteria isolated from dog skin, was unsuccessful with the majority of the tested isolates. Only competent E.coli and Klebsiella sp. strains could be transformed with pORF-hIL12 at a high frequency in vitro. Our results demonstrate that horizontal transfer of the ampicilin resistance gene from pORF-hIL12 into bacteria present on dog skin is rather unlikely due to failure of successful transformation and/or replication of the plasmid in the recipient bacterial cells.</p>	
	ANG		
	Šifra	B.04 Vabljeno predavanje	
	Objavljeno v	Association of Radiology and Oncology; Book of abstracts; 2013; Str. 76; Avtorji / Authors: Ambrožič Jerneja, Serša Gregor, Krhač Ana, Pavlin Darja, Tozon Nataša, Čemažar Maja	
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljeno predavanje)	
4.	COBISS ID	32649472	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO Radiologija in onkologija	
		ANG Radiology and oncology	
	Opis	SLO Prof. Maja Čemažar je urednica mednarodne revije Radiology and Oncology, ki izhaja v angleškem jeziku. Radiology and Oncology je multidisciplinarna revija, ki promovira tako slovensko kot tujo znanost na področju radiologije in onkologije v širšem mednarodnem prostoru.	
		ANG Prof. Maja Cemazar is editor of international journal Radiology and Oncology. Radiology and Oncology is a multidisciplinary journal promoting Slovenian and international research in the field of radiology and oncology internationally.	
	Šifra	C.04 Uredništvo mednarodne revije	
	Objavljeno v	Radiology and oncology. Čemažar, Maja (urednik 2013-), Cör, Andrej (urednik 2007-). Ljubljana: Slovenian Medical Society - Section of Radiology; [Zagreb]: Croatian Medical Association - Croatian Society of Radiology, 1992-. ISSN 1318-2099. <a href="http://ojs.szd.si/index.php/ro/index">http://ojs.szd.si/index.php/ro/index</a> .	

	[COBISS.SI-ID 32649472]
Tipologija	4.00 Sekundarno avtorstvo

## 8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>Z</sup>

V okviru projekta smo pripravili patent za evkariontski ekspresijski vektor z zapisom za pasji interlevkin 12 za uporabo v genski terapiji raka in druge uporabe.

Izum, ki ga razkrivamo v tej patentni prijavi, se nanaša na evkariontski ekspresijski vektor, ki nosi zapis za pasji IL-12 v obliki fuzijskega gena za obe podenoti IL-12. Vektor je uporaben za gensko zdravljenje psov. Predvsem je uporaben kot dodatno zdravljenje v kombinaciji s standardnimi terapijami v veterinarski onkologiji, kot so kirurška odstranitev tumorja, radioterapija in elektrokemoterapija, saj dodaja sistemski učinek k tem lokalnim terapijam. Primeren je za elektrogenski prenos v tumorje in tudi v mišice ali kožo. V kliničnih študijah v humani in veterinarski onkologiji se je genski prenos plazmidov, ki nosijo zapis za IL-12, že izkazal kot uspešna terapija za zdravljenje tumorjev. Predstavljen izum ima dve prednosti pred plazmidi, ki so jih uporabljali v veterinarskih kliničnih študijah do zdaj: prvič, ampicilinska rezistenca je zamenjana s kanamicinsko, ki jo dovoljuje regulatorne agencije za uporabo v kliničnih študijah, in drugič, humani ali mačji IL-12 je zamenjan z pasjim, kar reši ali vsaj zmanjša problem možnih alergičnih reakcij.

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>B</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>

SLO

Razvoj učinkovitega in varnega sistema za vnos transgenov v tarčne celice še vedno predstavlja enega od primarnih ciljev raziskovalcev na področju genske terapije raka. Idealna metoda genskega prenosa bi podpirala vnos dovolj velike koncentracije DNA v tarčne celice z minimalnimi nezaželenimi stranskimi učinki. Elektroporacija, kot način vnosa plazmide DNA, se je pokazala kot dobra alternativa virusnim načinom vnosa. Raziskave, ki smo jih izvedli znotraj projekta, so bile nadaljevanje našega dosedanjega dela in so obravnavale pomembne teme na področju varne uporabe genske terapije v kliničnih okoljih. Uspešno smo pripravili terapevtske plazmide s tkivno specifičnimi promotorji brez gena za odpornost proti antibiotikom. Tako pripravljene plazmide so v skladu z navodili Evropske agencije za zdravila in Ameriške agencije za hrano in zdravila in so primerni za planiranje in izvajanje kliničnih študij genske terapije. Poleg tega so rezultati študije, ki smo jo izvedli na področju horizontalnega genskega prenosa doprinesli k natančnejšemu ocenjevanju tveganja za izvajanje kliničnih študij s trenutno dostopnimi plazmidi in so v pomoč tudi različnim državnim inštitucijam pri podeljevanju dovoljenj za izvajanje kliničnih študij.

ANG

One of the major focuses of researchers on field of cancer gene therapy is development of efficient and safe systems for transfer of transgens in target cells. An ideal gene transfer method would allow introduction of sufficient concentration of DNA into the desired target cells with minimal side effect. Gene therapy using electroporation has proved to be a good alternative to viral methods. The research that we carried out within the project is the continuation of our work and has addressed important issues regarding safe use of cancer gene therapy in clinical setting. We successfully prepared therapeutic plasmids with tissue specific promoters without antibiotic resistance gene. Prepared plasmids are in accordance with regulatory agencies, European Medicines Agency and Food and Drug Administration, and are suitable for use in cancer gene therapy clinical trails. Additionally, the results of our study on the horizontal gene transfer into naturally occurring commensal bacteria contributes to the risk assessment for currently used plasmid DNA in clinical studies. These results are also very important for different authorities that are involved in risk assessment as well as granting permission for clinical trails.

## 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Tehnologija priprave plazmidov brez gena za odpornost proti antibiotikom se je izkazala za uspešno, zato nameravamo nadaljevati s kliničnimi študijami tudi z uporabo drugih terapevtskih genov. Priprava plazmidne DNA za klinične študije mora biti v skladu z natančnimi predpisi in mora biti pripravljena v skladu z dobro proizvodno prakso (GMP). Na osnovi naših rezultatov in rezultatov pridobljenih v okviru drugih projektov naše programske raziskovalne skupine lahko pripravimo podlago za ustanovitev spin-off podjetja za pripravo GMP plazmidne DNA, ki bi nudilo podporo potencialnim kupcem v Sloveniji in Evropi pri pripravi kliničnih študij. Poleg tega, morda bodo izsledki projekta celo zanimivi za farmacevtske in biotehnološke družbe. Če bo izsledke in produkte projekta možno patentirati, bomo pripravili in vložili patentne prijave in zascitili intelektualno lastnino ter navezali stike s potencialnimi uporabniki patentov. V okviru projekta smo pripravili evkarionski ekspresijski plazmid za izražanje humanega IL-12, katerega izražanje je uravnano z inducibilnim promotorjem p21 brez gena za odpornost proti antibiotikom za katerega bomo vložili patentno prijavo. Rezultate raziskovalnega projekta smo predstavili na mednarodnih konferencah, poletnih šolah in v obliki znanstvenih člankov. Na ta način smo promovirali našo državo kot visoko tehnološko družbo z inovativnim znanjem.

ANG

Preparation of therapeutic plasmids without antibiotic resistance gene has proven to be successful, therefore we intend to continue with clinical studies also with other therapeutic genes. The preparation of plasmid for clinical studies must be in accordance with the strict regulations and has to be prepared according to the GMP. This preparation of plasmids involves also substantial administrative work, therefore a spin-off company could be started in Slovenia to produce GMP grade plasmid preparation and to help all potential customers with administrative help in preparation application for clinical studies. Additionally, the results of the project can be also interesting for pharmaceutical and biotechnological companies. The patentability of new knowledge and product, as the result of the project, will be evaluated and if patentable, patent applications will be prepared, Intellectual property protected, and contacts established with potential users. Project results were presented on international conferences, summer schools and in the form of scientific papers, which is promotion of Slovenia as a high technological society with innovative knowledge.

## 10. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

**Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni**

Cilj		
<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.04</b>	<b>Dvig tehnološke ravni</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.05</b>	<b>Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.06</b>	<b>Razvoj novega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.07</b>	<b>Izboljšanje obstoječega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.08</b>	<b>Razvoj in izdelava prototipa</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.09</b>	<b>Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.10</b>	<b>Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.11</b>	<b>Razvoj nove storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.23</b>	<b>Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.24</b>	<b>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.29</b>	<b>Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text" value=""/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text" value=""/>
<b>F.32</b>	<b>Mednarodni patent</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.33</b>	<b>Patent v Sloveniji</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.34</b>	<b>Svetovalna dejavnost</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.35</b>	<b>Drugo</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

**Komentar**

--

**11.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!**  
**Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
<b>G.01</b>	<b>Razvoj visokošolskega izobraževanja</b>					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	



<b>G.03</b>	<b>Tehnološki razvoj</b>					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.04</b>	<b>Družbeni razvoj</b>					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.05.</b>	<b>Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete</b>					
<b>G.06.</b>	<b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>					
<b>G.07</b>	<b>Razvoj družbene infrastrukture</b>					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.08.</b>	<b>Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva</b>					
<b>G.09.</b>	<b>Drugo:</b>					

**Komentar**

--

**12.Pomen raziskovanja za sofinancerje<sup>11</sup>**

	Sofinancer			
1.	Naziv			
	Naslov			
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR	
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%	
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
	1.			
	2.			
3.				

	4.		
	5.		
	Komentar		
	Ocena		

### 13. Izjemni dosežek v letu 2014<sup>12</sup>

#### 13.1. Izjemni znanstveni dosežek

Ocena primernosti promotora p21 za z obsevanjem inducirano transkripcijsko ciljanje interlevkina 12 na mišjem tumorskem modelu.

Z rezultati raziskave smo pokazali, da je p21 promotor primeren kandidat za transkripcijsko ciljanje. Radio-genske terapije z radio-inducibilnim interlevkinom 12 je imela sinergistični protitumorski učinek v primerjavi s samo radioterapijo, s čimer smo potrdili terapevtska vrednost tega plazmida in dokazali njegovo uporabnost v kombinaciji z radioterapijo.

KAMENŠEK, Urška, SERŠA, Gregor, ČEMAŽAR, Maja. Evaluation of p21 promoter for interleukin 12 radiation induced transcriptional targeting in a mouse tumor model. *Molecular cancer*, ISSN 1476-4598, 2013, vol. 12, no. 136, str. [1-12]. <http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/136/abstract>, doi: 10.1186/1476-4598-12-136. [COBISS.SI-ID 1643131].

#### 13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Prof. dr. Maja Čemažar je bila povabljena za vodjo sekcije in diskutanta na Gordon Research seminarju Bioelectrochemistry, ki je potekal v Biddefordu, v ZDA.

ČEMAŽAR, Maja (diskutant). *Bioelectrochemistry*: discussion leader at the Gordon Research Conference on Bioelectrochemistry, 5.-6. 7. 2014 at University of New England in Biddeford, United States. Biddeford, 2014. [COBISS.SI-ID 1828987]

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

#### Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

Univerza na Primorskem Fakulteta za  
vede o zdravju

Maja Čemažar

**ŽIG**

Kraj in datum: 

Izola	13.3.2015
-------	-----------

**Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/105**

- <sup>1</sup> Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)
  - <sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
  - <sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)
  - <sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
  - <sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)
  - <sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.
- Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.
- Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)
- <sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
  - <sup>8</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)
  - <sup>9</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)
  - <sup>10</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)
  - <sup>11</sup> Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)
  - <sup>12</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2015 v1.00a  
D3-E7-49-B1-A2-CC-23-72-A8-EA-28-6C-8C-43-D3-32-4F-77-09-AE

## **Priloga 1**

# VEDA

Področje: 3.04 – Onkologija

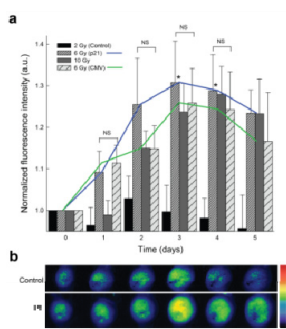
Dosežek: Ocena primernosti promotorja p21 za z obsevanjem inducirano transkripcijsko ciljanje interlevkina 12 na mišjem tumorskem modelu

Vir: KAMENŠEK, Urška, SERŠA, Gregor, ČEMAŽAR, Maja. Evaluation of p21 promoter for interleukin 12 radiation induced transcriptional targeting in a mouse tumor model. *Molecular cancer*, ISSN 1476-4598, 2013, vol. 12, no. 136, str. [1-12].

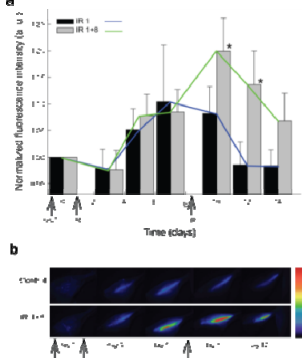
<http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/136/abstract>, doi: [10.1186/1476-4598-12-136](https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-136). [COBISS.SI-ID 1643131]

Reporterski eksperimentalni modeli

Stabilno transfecirani tumorji



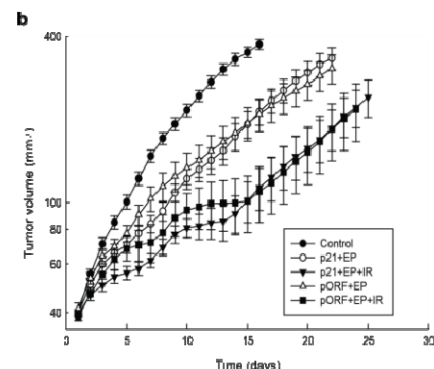
Prehodno transfecirane mišice



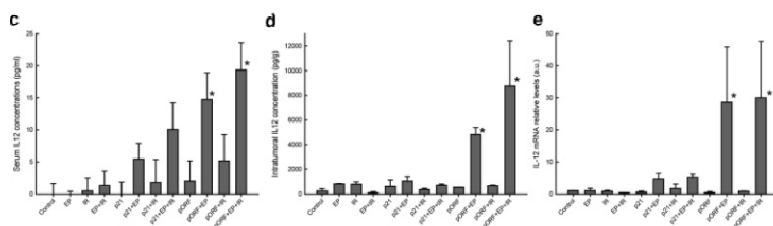
Terapevtska učinkovitost

Protitumorski učinek

	DT (days)	GD (days)	CR (n)	N
Control	4.0 ± 0.27	0	0	18
EP	2.88 ± 0.40	-0.35 ± 0.40	0	12
IR	4.73 ± 0.38	0.73 ± 0.38	0	16
EP+IR	4.52 ± 1.00	1.50 ± 1.00	0	10
p21	3.86 ± 0.50	0.83 ± 0.50	0	12
p21+EP	6.47 ± 0.94	3.45 ± 0.94	0	16
p21+IR	5.67 ± 0.96	2.64 ± 1.96	0	16
p21+EP+IR	17.45 ± 5.84	14.41 ± 5.84*	1 (8.3%)	12
pORF	4.27 ± 0.44	1.25 ± 0.44	0	12
pORF+EP	5.63 ± 1.19	2.60 ± 1.58	1 (6.7%)	15
pORF+IR	4.93 ± 0.61	0.90 ± 0.61	0	16
pORF+EP+IR	23.00 ± 7.18	18.20 ± 7.04*	3 (25%)	12



Izražanje interlevkina 12



Namen raziskave je bil oceniti primernost p21 promotorja za z obsevanjem inducirano transkripcijsko ciljanje s končnim ciljem testirati terapevtsko učinkovitost kombinirane radio-genske terapije s terapevtskim genom za interlevkin 12 pod kontrolo p21 promotorja. Z uporabo reporterskih eksperimentalnih modelov smo dokazali, da se p21 promotor inducira z obsevanjem, da indukcija ni odvisna od doze in da ga lahko ponovno induciramo. Radio-genska terapija z interlevkinom 12 pod kontrolo p21 promotorja je imela dober protitumorski učinek s statistično značilnim zaostankom v rasti tumorjev, ki je bil primerljiv s tistim po terapiji s konstitutivnim promotorjem. S to raziskavo smo dokazali, da je p21 promotor primeren kandidat za transkripcijsko ciljanje. Radio-genske terapije z radio-inducibilnim interlevkinom 12 je imela sinergistični protitumorski učinek v primerjavi s samo radioterapijo, s čimer smo potrdili terapevtska vrednost tega plazmida in dokazali njegovo uporabnost v kombinaciji z radioterapijo.