

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/77



## ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	J3-4211
<b>Naslov projekta</b>	Antiangiogena genska terapija raka: tarčno zdravljenje z uporabo elektroporacije in magnetnih nanodelcev kot dostavnih sistemov
<b>Vodja projekta</b>	8800 Gregor Serša
<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>	302 ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	1538 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko 2413 Univerza na Primorskem Fakulteta za vede o zdravju 2431 NANOTESLA INSTITUT - Razvojni center nanotehnologij na področju magnetnih materialov in kompozitov
<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

Namen projekta je bil razvoj novih pristopov genske terapije za zdravljenje malignega melanoma, ki temeljijo na antiangiogenih mehanizmihi. Na eksperimentalnih tumorjih smo preizkusili učinek novih plazmidov z antiangiogenim delovanjem na tumorje z uporabo nevirusnih dostavnih

sistemov; elektroporacijo in magnetnimi nanodelci. Za uspešnejšo translacijo v kliniko smo preizkusili kombinacijo genske terapije z radioterapijo.

Pripravili smo dva nova antiangiogena plazmida, enega ki kodira shRNA proti endoglinu (CD105) in drugega, ki kodira shRNA proti celični adhezijski molekuli melanoma (CD146/MCAM). Tarčni molekuli sta specifični za endotelijske celice v tumorjih in celice visoko metastatskega melanoma. Uporabili smo tudi plazmid AMEP, ki ga je pripravil in delno validiral naš industrijski partner BioAlliance Pharma (Francija). Plazmid AMEP ima tako antiangiogeni kot neposredni citotoksični učinek na celice in tumorje melanoma.

Vse tri plazmide smo uporabili za tretiranje dveh različnih tumorskih modelov melanoma pri eksperimentalnih živalih; B16F1 z nizkim metastatskim potencialom in B16F10 z visokim metastatskim potencialom. Antiangiogeni učinek plazmida proti CD105 pa smo preverili še na tumorskem modelu mišjega adenokarcinoma dojke TS/A.

Za vnos plazmidov smo uporabili nevirusne dostavne sisteme; elektroporacijo in magnetne nanodelce oz. magnetofekcijo. Z elektrogensko terapijo smo določili učinkovitost transfekcije vseh treh plazmidov v celicah *in vitro*, ter njihov učinek na proliferacijo, migracijo, invazijo in adhezijo celic. Antiangiogeni potencial plazmidov smo testirali *in vitro* s testom sposobnosti tvorjenja kapilaram podobnih struktur (tube formation assay). Enake teste za določanje bioloških učinkov *in vitro*, smo izvedli tudi po magnetofekciji plazmida, ki kodira shRNA proti CD146.

Nadaljevali smo s proučevanjem antiangiogenega in protitumorskega učinka plazmidov *in vivo* na eksperimentalnih živalih. Z intravitalno mikroskopijo na modelu dorzalnega okna smo opazili dober antiangiogeni in posledično tudi protitumorski učinek plazmida AMEP na B16F1 in B16F10 tumorje in plazmida, ki kodira shRNA proti CD105, na TS/A tumorje. Na induciranih subkutanih B16F1 in B16F10 tumorjih smo dokazali, da imajo vsi trije preučevani plazmidi dober protitumorski in antiangiogeni učinek. Dodatno pa smo po genski terapiji B16F10 tumorjev s plazmidom AMEP in plazmidom, ki kodira shRNA proti CD105 dokazali še protimetastatski učinek. Na tumorskem modelu TS/A smo preizkusili še kombinacijo antiangiogene, kot adjuvantne terapije, v kombinaciji z radioterapijo. Izkazalo se je, da je najboljša kombinacija večkratna elektrogenska terapija z enkratnim obsevanjem.

Ugotovili smo, da imajo plazmid AMEP in plazmida, ki kodirata shRNA proti CD105 ali CD146, močan protitumorski učinek na melanom. Potrdili smo tudi, da je plazmid, ki kodira shRNA proti CD105, učinkovit v kombinaciji z radioterapijo na tumorskem modelu TS/A.

ANG

The aim of project was the development of new gene therapy approaches, based on antiangiogenic mechanisms for the treatment of malignant melanoma. The new plasmids encoding for anti-angiogenesis of tumors were tested in experimental tumors by non-viral delivery systems; electroporation and magnetic nanoparticles. For better translation into the clinics, combined modality treatment with radiotherapy was tested.

We have constructed two new plasmids, one encoding siRNA against endoglin (CD105) and the other siRNA against melanoma cell adhesion molecule (CD146/MCAM). Both targeted molecules are specific for endothelial cells in tumors and melanoma cells. Plasmid AMEP, which was already prepared and validated to some extent by our industrial partner BioAlliance Pharma (France), was also used.

All the plasmids were tested as potential antitumor therapies for the treatment of two different models of murine melanoma in experimental animals; B16F1 with low metastatic potential and B16F10 with high metastatic potential. Antiangiogenic potential of plasmid encoding shRNA against CD105 was tested on murine mammary adenocarcinoma TS/A tumor model. As plasmid delivery systems, non-viral methods were used; electroporation and magnetic nanoparticles (*i.e.* magnetofection).

With electrogene therapy the transfection efficiency of all three plasmids in cells *in vitro* was evaluated and the effect of plasmids on cell's proliferation, migration, invasion and adhesion were determined. Antiangiogenic potential of constructed plasmids was tested *in vitro* by tube formation assay on endothelial cells. The same *in vitro* tests for determining biological properties were performed after magnetofection of plasmid encoding shRNA against CD146. The anti-angiogenic and antitumor effects were further investigated by intravital microscopy in dorsal window chamber model.

Good antiangiogenic and antitumor effects were observed after gene therapy with plasmid AMEP in B16F1 and B16F10 melanoma tumors and plasmid encoding shRNA against CD105 in TS/A tumor. *In vivo*, on experimentally induced subcutaneous tumors good antitumor and antiangiogenic effect after gene therapy with all three plasmids were observed. Furthermore,

antimetastatic effect was observed after gene therapy with plasmid AMEP and plasmid encoding shRNA against CD105 in B16F10 tumor. In addition, a plasmid encoding shRNA against CD105 also had antiangiogenic effect in TS/A tumor model. In TS/A tumor model the combination of antiangiogenic therapy with radiotherapy was tested. The best treatment effectiveness was observed after repetitive gene therapy combined with single radiation dose.

The results demonstrated that plasmid AMEP and plasmids encoding shRNA against CD105 or CD146 have strong antitumor effectiveness on melanoma. The effectiveness of combined antiangiogenic therapy with plasmid encoding shRNA against CD105 and radiation therapy was confirmed on TS/A tumor model.

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

Sprva smo pripravili dva plazmida z antiangiogenim delovanjem, ki ciljata specifične tarče na tumorskih in endotelijskih celicah. Izmed izbranih molekul siRNA proti CD105 in CD146 smo izbrali tiste z največjim utišanjem izražanja CD105 in CD146. S standardnimi molekularno biološkimi tehnikami (restrikcija, ligacija in transformacija v ustrezni bakterijski sev) smo pripravili dva plazmida, ki kodirata kratke nekodirajoče molekule RNA (shRNA) z nukleotidnim zaporedjem, enakim najučinkovitejši molekuli siRNA proti CD105 in CD146. V sodelovanju z mednarodnim partnerjem BioAlliance Pharma (Francija) smo dobili plazmid AMEP, ki kodira antiangiogeni peptid metargidina. Plazmid AMEP smo vključili v raziskave antiangiogenih mehanizmov za razvoj novih pristopov genske terapije za zdravljenje melanoma. Za določanje antiangiogenega in protitumorskega delovanja *in vitro* smo plazmide vnesli v različne tumorske in endotelijske celice in pri tem za vnos uporabili fizikalno metodo elektroporacijo.

#### Plazmid, ki kodira shRNA proti CD105

Antiangiogeno in protitumorsko delovanje elektrotransfeciranega plazmida, ki kodira shRNA proti CD105, *in vitro* smo dokazali pri mišji endotelijski celični liniji (2H-11), v kateri se izraža endoglin. Dokazali smo, da elektrotransfekcija endotelijskih celic 2H-11 s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD105, učinkovito utiša CD105 na ravni mRNA in ravni izražanja proteinov. To utišanje vpliva na zmanjšanje proliferacije, zaviranje nastanka kapilaram podobnih struktur, zmanjša migracijo in invazijo ter poveča adhezijo celic. Antiangiogeno delovanje elektrotransfeciranega plazmida, ki kodira shRNA proti CD105, smo potrdili v *in vivo* poskusih na izbranem mišjem tumorskem modelu adenokarcinoma dojke TS/A. Na osnovi preliminarnih raziskav s qRT-PCR na različnih celičnih linijah in tumorjih smo ugotovili, da kot ustrezen tumorski model za antiangiogeno terapijo lahko uporabimo le tistega, ki ne izraža endoglina. Tako s terapijo lahko vplivamo le na endoglin, ki se izraža na endotelijskih celicah v krvnih žilah miši in ne direktno na tumorske celice same. Protitumorsko delovanje plazmida, ki kodira shRNA proti CD105, smo določili s testom zaostanka rasti tumorjev. Rezultati so pokazali učinkovito upočasnitev rasti tumorjev v času intenzivnega izražanja shRNA proti CD105 glede na kontrolne skupine tumorjev. Rezultate elektrotransfekcije s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD105, smo podkrepili s histološko analizo. Po 3x elektrotransfekciji tumorjev s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD105, se je odstotek nekroze povečal, število žil v viabilnih delih tumorjev, ki smo jih določali z imunohistokemičnim barvanjem histoloških rezin tumorjev s protitelesi proti CD31 in CD105, pa se je zmanjšalo. Izvedli smo tudi poskuse antiangiogenega delovanja plazmida, ki kodira shRNA proti CD105, na tumorjih, ki rastejo v dorzalnem oknu. Dosedanji rezultati kažejo, da elektrotransfekcija s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD105, preprečuje nastanek tumorskega žilja, hkrati pa poškoduje aktivirane normalne kapilare v dorzalnem oknu na mestu tumorja že 24 ur po elektrotransfekciji. V vseh kontrolnih skupinah so žile v tumorjih nemoteno nastajale in tvorile kaotičen pletež žil. V skupini z elektrotransfekcijo tumorjev s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD105, smo že 1 dan po terapiji opazili hemoragična območja na mestih, kjer je prišlo do razgradnje žil in izlitja eritrocitov. Učinek smo ovrednotili z analizo slik z merjenjem površine žil v dorzalnem oknu pred in po elektrotransfekciji in pokazali, da se je površina žil v terapevtski skupini zmanjšala za ~90% in je ostala zmanjšana vseh 6 dni. Rezultati poskusov kažejo na antiangiogeni in potencialno tudi žilno razdiralni učinek elektrotransfekcije s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD105, na žilah, ki izražajo endoglin. Vsi omenjeni rezultati so bili objavljeni v dveh znanstvenih člankih, in sicer Dolinsek T. et al, PLoS One, 2013 in Dolinsek T. et al, Curr Gene Ther, 2015.

Intratumska elektrotransfekcija plazmida, ki kodira shRNA proti CD105, je pokazala velik potencial v kombinaciji z lokalnim obsevanjem. Rezultati merjenja zaostanka v rasti tumorjev so pokazali uspešnost terapije. Protitumorsko delovanje plazmida smo potrdili *in vivo* na dveh

podvrstah mišjega melanoma, B16F1 in B16F10, ki se razlikujeta po metastatskem potencialu. Dokazali smo, da ima plazmid, ki kodira shRNA proti CD105, močan protitumorski in antiangiogeni učinek, ki se kaže tudi v obliki popolnih odgovorov na terapijo.

#### **Plazmid AMEP**

Na različnih tumorskih in endotelijskih celičnih linijah smo določili citotoksičnost plazmida AMEP po elektrotransfekciji in vpliv na proliferacijo celic. Po elektrotransfekciji plazmida AMEP v melanomski celični liniji B16F1 in B16F10 smo pokazali, da sposobnost celične migracije zmanjša v različnem obsegu, in sicer pri celični liniji B16F1 za približno 70%, pri celični liniji B16F10 pa za 50%. Uspešno smo zmanjšali tudi invazijo celic. Antiangiogeno delovanje plazmida AMEP smo določali s testom sposobnost tvorjenja kapilaram podobnih struktur. Določili smo izražanje integrinov na izbranih celičnih linijah ter stopnjo izražanja mRNA proteina AMEP po genski elektrotransfekciji celic. Ugotovili smo, da elektrotransfekcija endotelijskih celic z antiangiogenim plazmidom AMEP zmanjša možnost nastajanja kapilaram podobnih struktur, poveča število celic, ki niso vključene v te strukture, in zmanjša dolžino teh struktur. Rezultati kažejo, da je protitumorsko delovanje po genski transfekciji celic melanoma odvisno od izražanja integrinov, ne pa od količine proizvedenega proteina AMEP. Pri antiangiogenem delovanju pa je učinek odvisen tako od izražanja integrinov kot tudi od količine proteina AMEP. Vsi omenjeni rezultati so bili objavljeni v znanstvenem članku v mednarodni reviji *Journal of Membrane Biology* leta 2013 (Bosnjak M et al, *J Membr Biol*, 2013).

Naredili smo tudi preliminaren poskus optimizacije, pri katerem smo spremljali učinke kombinirane terapije s plazmidom AMEP in obsevanjem celične linije melanoma B16F1 *in vitro*. S plazmidom AMEP smo izvedli dvakratno intratumorsko terapijo na dveh podvrstah mišjega melanoma, B16F1 in B16F10, *in vivo*. Terapija je bila enako učinkovita pri obeh podvrstah melanoma. Da bi bolje razumeli mehanizem delovanja smo določili nivo izražanja proteina AMEP *in vivo* in le-tega povezali z izražanjem integrinov na celicah mišjega melanoma. Kljub višjemu nivoju izražanja AMEP v mišjem melanomu B16F10, učinek ni bil bolj izrazit kot na modelu mišjega melanoma B16F1, kjer se je protein izražal v manjši meri. Zaključili smo, da odločilno vlogo igra število integrinov, ki so prisotni na melanomskih celicah in s tem potrdili hipotezo, ki smo jo zastavili na podlagi *in vitro* rezultatov. Naredili smo podroben histološki pregled, ter določili obseg nekroze, apoptoze ter proliferajočih celic. Terapija s plazmidom AMEP bistveno vpliva na vse tri preučevane parametre. S pomočjo histologije smo določali tudi število žil v viabilnih delih tumorjev po imunohistokemičnem barvanju rezin tumorjev s protitelesi proti CD31. Plazmid AMEP bistveno vpliva na število žil in ima tako antiangiogeni učinek. Antiangiogeni učinek smo preverili tudi z modelom dorzalnega okna, kjer smo v podkožje miši v področju okna nasadili tumorske celice melanoma. Z intravitalno mikroskopijo smo spremljali nastajanje in morfologijo tumorskega žilja. Tudi *in vivo* smo ugotovili, da plazmid AMEP deluje močno antiangiogeno. Vsi omenjeni rezultati so bili zbrani v znanstvenem članku, ki pa je tik pred sprejetjem v objavo (Bosnjak M et al, *Gene Therapy*, 2015).

Po programu projekta je bila predvidena tudi intramuskularna transfekcija plazmida AMEP in merjenje učinka na podkožne tumorje melanoma. Na osnovi več poskusov smo zaključili, da intramuskularni genski prenos plazmida AMEP nima systemskega protitumorskega učinka in zato raziskav v tej smeri nismo nadaljevali.

#### **Plazmid, ki kodira shRNA proti CD146**

Antiangiogeni in protitumorski učinek plazmida, ki kodira shRNA proti CD146, smo najprej testirali na treh mišjih celičnih linijah (endotelijski 2H-11 in melanomski B16F1 in B16F10) *in vitro* in za tem še na podkožnih B16F10 tumorjih melanoma pri poskusnih miših *in vivo*. Za vnos plazmida, ki kodira shRNA proti CD146, v celice *in vitro* in tumorje *in vivo* smo uporabili dve nevirusni metodi, magnetofekcijo in elektroporacijo.

Najprej smo iz nabora molekul siRNA proti CD146 izbrali najučinkovitejšo glede na rezultate *in vitro* poskusov ter na podlagi njenega nukleotidnega zaporedja pripravili plazmid, ki kodira shRNA proti CD146. Nato smo preverili vpliv pripravljenega plazmida po transfekciji vseh treh celičnih linij na znižanje ravni mRNA in proteinov za CD146 in še testirali vpliv na proliferacijo in migracijo celic ter antiangiogeni učinek *in vitro* z naslednjimi testi: test proliferacije celic, test migracije in test sposobnosti tvorjenja kapilarem podobnih struktur. Rezultati *in vitro* testiranj so pokazali, da sta se ne glede na uporabljeno metodo transfekcije raven mRNA in proteinov za CD146 v celičnih linijah mišjega melanoma bistveno znižali, medtem ko sta se v mišji endotelijski celični liniji bistveno znižali le po elektrotransfekciji. Tako po elektrotransfekciji kot magnetofekciji sta bili proliferacija in

migracija celic mišjega melanoma bistveno zmanjšani. Elektrotransfekcija s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD146, je bistveno zmanjšala dolžino in velikost kapilaram podobnih struktur kot tudi število stikov med strukturami, kar dokazuje antiangiogeni učinek. Magnetofekcija endotelijskih celic s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD146, zopet ni pokazala nobenega učinka.

Za tem smo preverili še protitumorski učinek magnetofekcije in elektrotransfekcije s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD146, na B16F10 melanomu pri poskusnih miših. Trikratna zaporedna genska terapija B16F10 tumorjev s plazmidom, ki kodira shRNA proti CD146, je imela protitumorski učinek, ki smo ga dokazali tako z zaostankom v rasti tumorjev kot z ozdravitvami. Po magnetofekciji tumorjev smo v primerjavi z elektroporacijo dosegli manjši protitumorski učinek, kar je verjetno posledica manjše učinkovitosti magnetofekcije pri transfekciji endotelijskih celic v tumorju. Po magnetofekciji je bil zaostanek v rasti tumorjev v primerjavi s kontrolnimi 5,3 dni, po elektrotransfekciji pa kar 7,8 dni in s celo 33% ozdravitvijo. Vsi omenjeni rezultati so bili objavljeni v znanstvenem članku v mednarodni reviji *Molecular Therapy-Nucleic Acids* leta 2014 (Prosen L. et al, *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014).

Dodatno smo protitumorsko delovanje plazmida, ki kodira shRNA proti CD146, potrdili še *in vivo* na dveh podvrstah mišjega melanoma, B16F1 in B16F10, ki se razlikujeta po metastatskem potencialu. Dokazali smo, da ima plazmid, ki kodira shRNA proti CD146, močan protitumorski in antiangiogeni učinek, ki se kaže tudi v obliki popolnih odgovorov na terapijo.

Dokazali smo, da imajo vsi trije plazmidi približno enak učinek na zdravljenje tumorjev mišjega melanoma. Dvakratna intratumorska elektrogenska terapija kaže na enako učinkovitost pri obeh podvrstah mišjega melanoma. Z vsemi zgoraj opisanimi poskusi smo dosegli namen projekta in sicer razvoj novih pristopov genske terapije za zdravljenje malignega melanoma, ki temeljijo na antiangiogenih mehanizmih. V študiji smo pripravili dva nova plazmida, ki kodirata shRNA proti CD105 in CD146, ter dokazali njuno antiangiogeno učinkovitost na celicah *in vitro* in tumorjih *in vivo*. Enako smo dokazali tudi s plazmidom AMEP.

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

Delo na raziskovalnem projektu je vseskozi potekalo v skladu s časovno razporeditvijo delovnih sklopov. Najprej smo pripravili dva plazmida z antiangiogenim delovanjem proti CD105 in CD146 ter dodatno od industrijskega partnerja BioAlliance Pharma (Francija) dobili še plazmid AMEP. Nato smo pričeli z *in vitro* raziskavami antiangiogenega in protitumorskega delovanja pripravljenih plazmidov in plazmida AMEP na izbranih endotelijskih in tumorskih celičnih linijah. Za vnos plazmidov v tumorske in endotelijske celice smo uporabili fizikalno metodo elektroporacijo, za vnos plazmida, ki kodira shRNA proti CD146, pa dodatno še metodo magnetofekcije z magnetnimi nanodelci. Nadaljevali smo s poskusi z intravitalno mikroskopijo, kjer smo na modelu dorzalnega okna dokazali antiangiogeni učinek plazmida AMEP in nato še plazmida, ki kodira shRNA proti CD105. Naši rezultati kažejo, da elektrotransfekcija tumorjev s plazmidom AMEP in plazmidom, ki kodira shRNA proti CD105, prepreči razvoj novega tumorskega žilja, medtem ko v vseh kontrolnih skupinah žile v tumorjih nemoteno nastajajo in tvorijo kaotičen pletež žil. Kvantitativno smo ovrednotili parametre pretoka in difuzije v tumorjih. Protitumorsko učinkovitost antiangiogene terapije na tumorjih melanoma pri miših smo dokazali na tumorjih, ki smo jih subkutano nasadili na bok miši. Protitumorsko učinkovitost vseh treh plazmidov po elektrotransfekciji smo določili s testom zaostanka v rasti. Pri plazmidu, ki kodira shRNA proti CD146, smo protitumorske učinke spremljali tudi po magnetofekciji.

Uspešno protitumorsko delovanje plazmidov smo potrdili tudi s histološkim pregledom stopnje nekroze in določanjem števila celic, ki po terapiji ostanejo proliferativne. Preliminarni rezultati so pokazali, da plazmid AMEP v kombinaciji z obsevanjem nima učinka, zato smo ta sklop raziskave zaključili. Intratumorska elektrotransfekcija plazmida, ki kodira shRNA proti CD105, pa je pokazala velik potencial v kombinaciji z lokalnim obsevanjem. S spremljanjem zaostanka v rasti tumorjev smo dokazali, da je taka kombinirana terapija zelo uspešna, zato smo se odločili za nadaljnje raziskovanje tega področja.

Ocenjujemo, da smo izvedli vse predvidene sklope raziskave in objavili 8 znanstvenih člankov v mednarodnih revijah, 2 pa sta še v postopku objave.

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

Preliminarni *in vitro* poskusi, kjer smo spremljali učinke kombinirane terapije s plazmidom AMEP in obsevanjem celične linije melanoma B16F1, niso pokazali zadovoljivih rezultatov za nadaljevanje poskusov na laboratorijskih živalih. Kombinirana terapija obsevanja s plazmidom AMEP ni doprinesla k manjši stopnji preživetja celic *in vitro*. Na podlagi podatkov iz najnovejše znanstvene literature in preliminarnih rezultatov v objavljeni literaturi, ter v skladu s smernicami za delo z laboratorijskimi živalmi, smo se odločili, da poskusov ne bomo nadaljevali na *in vivo* nivoju. Ostalih bistvenih sprememb programa raziskovalnega projekta ni bilo.

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

Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID 1469819 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO Večkratni vnos siRNA proti endoglinu v celice mamarnega adenokarcinoma prepreči angiogenezo in zavre rast tumorjev
	ANG Multiple delivery of siRNA against endoglin into murine mammary adenocarcinoma prevents angiogenesis and delays tumor growth
Opis	SLO Endoglin je ko-receptor TGF-beta, ki sodeluje pri aktivaciji signalne poti, ki omogoča proliferacijo endotelijskih celic in migracijo v angiogenem tumorskem žilju. Utišanje izražanja endoglina zato predstavlja atraktiven pristop za antiangiogeno terapijo tumorjev. Namen raziskave je bil ovrednotiti terapevtski potencial majhnih interferenčnih RNA (siRNA) molekul proti endoglinu <i>in vitro</i> v humanih in mišjih endotelijskih celicah in <i>in vivo</i> v mamarnem adenokarcinomu TS/A v BALB/c miših. Rezultati raziskave so pokazali, da imajo siRNA proti endoglinu dober antiangiogeni terapevtski potencial <i>in vitro</i> , saj se je učinkovito zmanjšalo izražanje mRNA za endoglin in proteina v mišjih in humanih mikrovaskularnih endotelijskih celicah po lipofekciji in s tem inhibiralo proliferacijo endotelijskih celic in tvorbo žilam podobnih struktur. <i>In vivo</i> utišanje endoglina s trojnim elektroprenosom siRNA molekul v mamarni adenokarcinom TS/A učinkovito zmanjša izražanje mRNA, število tumorskih krvnih žil in rast tumorjev. Dobljeni rezultati kažejo, da je utišanje endoglina obetavna antiangiogena tumorska terapija, ki bi bila uporabna v kombinaciji z že uveljavljenimi citotoksičnimi terapevtskimi pristopi.
	ANG Endoglin is a TGF-beta co-receptor that participates in the activation of a signaling pathway that mediates endothelial cell proliferation and migration in angiogenic tumor vasculature. Therefore, silencing of endoglin expression is an attractive approach for antiangiogenic therapy of tumors. The aim of our study was to evaluate the therapeutic potential of small interfering RNA (siRNA) molecules against endoglin <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in human and murine endothelial cells and <i>in vivo</i> in TS/A mammary adenocarcinoma growing in BALB/c mice. Results of our study showed that siRNA molecules against endoglin have a good antiangiogenic therapeutic potential <i>in vitro</i> , as expression of endoglin mRNA and protein levels in mouse and human microvascular endothelial cells after lipofection were efficiently reduced, which resulted in the inhibition of endothelial cell proliferation and tube formation. <i>In vivo</i> , silencing of endoglin with triple electrotransfer of siRNA molecules into TS/A mammary adenocarcinoma also significantly reduced the mRNA levels, number of tumor blood vessels and the growth of tumors. The obtained results demonstrate that silencing of endoglin is a promising antiangiogenic therapy of tumors that could be used as an adjunct to the established cytotoxic treatment approaches.
Objavljeno v	Public Library of Science; PloS one; 2013; Vol. 8, iss. 3; str. [1-12]; Impact Factor: 3.534; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.663; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Dolinšek Tanja, Markelc Boštjan, Serša Gregor, Cör Andrej, Štimac Monika, Lavrenčak Jaka, Brožič Andreja, Kranjc Simona, Čemažar Maja

	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	512363065	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Biološke značilnosti melanomskih in endotelijskih celic po elektrogenskem vnosu plazmida AMEP so odvisne od količine integrinov na celicah
		ANG	Biological properties of melanoma and endothelial cells after plasmid AMEP gene electrotransfer depend on integrin quantity on cells
	Opis	SLO	<p>Biološki odgovor melanomskih in endotelijskih celic na terapijo s peptidom AMEP (Antiangiogenic MEtargidin Peptide) je le slabo raziskan. Prav zato smo proučevali antiproliferativni, antimetastatski in antiangiogeni učinek AMEP-a na mišjih melanomskih in humanih endotelijskih celicah po elektrogenskem vnosu plazmida v celice in vitro.</p> <p>Plazmid AMEP nosi zapis za disintegrinsko domeno metargidina, ki cilja specifične integrine in ima posledično citotoksičen in antiproliferativni učinek na celice mišjega melanoma in humane endotelijske celice. Med metastatskimi sposobnosti celic smo opazovali sposobnost migracije, invazije in adhezije. Plazmid AMEP ima močan učinek na sposobnost migracije mišjih melanomskih in humanih endotelijskih celic. Prav tako se učinek izraža na invaziji visoko metastatske celične linije mišjega melanoma B16F10 in humanih endotelijskih celičnih linijah. Spremembe adhezija na Matrigel™ ali fibronektin ni bilo moč zaznati. Antiangiogeni učinek, ki smo ga ovrednotili s testom sposobnosti tvorjenja kapilaram podobnih struktur in vitro, se je po elektrogenskem vnosu plazmida AMEP izraziteje izrazil na humanih mikrovaskularnih endotelijskih celic (HMEC-1) kot pa na humanimi umbilikalnimi endotelijskimi celicami ven (HUVEC). Raziskava kaže na to, da naj bi bila antiproliferativni in antimetastatski biološki odgovor po elektrogenskem vnosu plazmida AMEP v mišje melanomske celice, odvisna od količine prisotnih integrinov na melanomskih celicah in ne od nivoja izražanja peptida AMEP. Močan antiangiogeni učinek, ki je bil izražen na humanih endotelijskih celičnih linijah, pa je deloma odvisen od količine prisotnih integrinov in je deloma najverjetneje tudi dozno odvisen od količine peptida AMEP.</p>
		ANG	<p>The data on the biological responsiveness of melanoma and endothelial cells that are targeted by Antiangiogenic MEtargidin Peptide (AMEP) are limited; therefore, the antiproliferative, antimetastatic and antiangiogenic effects of AMEP were investigated in murine melanoma and human endothelial cells after plasmid AMEP gene electrotransfer into the cells in vitro. Plasmid AMEP, a plasmid coding for the disintegrin domain of metargidin targeting specific integrins, had cytotoxic and antiproliferative effects on murine melanoma and human endothelial cells. Among the metastatic properties of cells, migration, invasion and adhesion were investigated. Plasmid AMEP strongly affected the migration of murine melanoma and human endothelial cell lines and also affected the invasion of highly metastatic murine melanoma B16F10 and human endothelial cell lines. There was no effect on cell adhesion on Matrigel™ or fibronectin in all cell lines. The antiangiogenic effect was shown with tube formation assay, where human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) proved to be more sensitive to plasmid AMEP gene electrotransfer than the human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC). The study indicates that antiproliferative and antimetastatic biological responses to gene electrotransfer of plasmid AMEP in murine melanoma cells were dependent on the integrin quantity on melanoma cells and not on the expression level of AMEP. The strong antiangiogenic effect expressed in human endothelial cell lines was only partly dependent on the quantity of integrins and seemed to be plasmid AMEP dose dependent.</p>
			Springer; Special electroporation-based technologies and treatments; The journal of membrane biology; 2013; Str. 803-819; Impact Factor:

	Objavljeno v	2.174; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.903; WoS: CQ, DR, UM; Avtorji / Authors: Bošnjak Maša, Prosen Lara, Dolinšek Tanja, Blagus Tanja, Markelc Boštjan, Čemažar Maja, Bouquet Céline, Serša Gregor	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	1898875	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Utišanje gena Mcam s tehnologijo RNA interference po uporabi magnetofekcije ima protitumorski učinek na mišji melanom
		ANG	Mcam silencing with RNA interference using magnetofection has antitumor effect in murine melanoma
	Opis	SLO	Celična adhezijska molekula melanoma (MCAM) sodeluje pri razvoju melanoma in njegovem napredovanju, vključno z invazijo, metastatskim potencialom ter angiogenezo. Molekula MCAM zato predstavlja potencialno tarčo pri genski terapiji melanoma, katere izražanje bi lahko zmanjšali s posegom v post-transkripcijski nivo izražanja tarčnega gena s tehnologijo RNA interference. Tako smo pripravili plazmidno DNA, ki kodira kratko lasnično molekulo RNA proti genu Mcam (pMCAM), in preučevali njen protitumorski in antiangiogeni učinek. Raziskavo smo delali na celični liniji mišjega melanoma in endotelija in vitro ter na podkožnih tumorjih pri miših in vivo. Po genski terapiji s plazmidom pMCAM smo spremljali vpliv na proliferacijo in migracijo celic, ter antiangiogeni in protitumorski učinek. Za vnos plazmida pMCAM v celice in tumorje smo uporabili magnetofekcijo in njeno učinkovitost primerjali z učinkovitostjo elektroporacije. Po genski terapiji s plazmidom pMCAM smo dosegli učinkovito zmanjšanje proliferacije in migracije celic melanoma, antiangiogeni učinek na endotelijske celice ter protitumorski na tumorje melanoma. Magnetofekcija se je izkazala kot učinkovit nevirusni dostavni sistem za plazmid pMCAM v celice melanoma in vitro in tumorje melanoma in vivo. Pri terapiji tumorjev in vivo je bila magnetofekcija v primerjavi z elektroporacijo manj učinkovita, saj do antiangiogenega učinka po utišanju gena Mcam z magnetofekcijo ni prišlo.
		ANG	The melanoma cell adhesion molecule (MCAM) is involved in melanoma development and its progression, including invasiveness, metastatic potential and angiogenesis. Therefore, MCAM represents a potential target for gene therapy of melanoma, whose expression could be hindered with posttranscriptional specific gene silencing with RNA interference technology. In this study, we constructed a plasmid DNA encoding short hairpin RNA against MCAM (pMCAM) to explore the antitumor and antiangiogenic effects. The experiments were performed in vitro on murine melanoma and endothelial cells, as well as in vivo on melanoma tumors in mice. The antiproliferative, antimigratory, antiangiogenic and antitumor effects were examined after gene therapy with pMCAM. Gene delivery was performed by magnetofection, and its efficacy compared to gene electrotransfer. Gene therapy with pMCAM has proved to be an effective approach in reducing the proliferation and migration of melanoma cells, as well as having antiangiogenic effect in endothelial cells and antitumor effect on melanoma tumors. Magnetofection as a developing nonviral gene delivery system was effective in the transfection of melanoma cells and tumors with pMCAM, but less efficient than gene electrotransfer in in vivo tumor gene therapy due to the lack of antiangiogenic effect after silencing Mcam by magnetofection.
	Objavljeno v	Nature Pub. Group; Molecular therapy, Nucleic acids; 2014; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Markelc Boštjan, Dolinšek Tanja, Mušič Branka, Čemažar Maja, Serša Gregor	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	



4.	COBISS ID		1348475	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Intravitalna mikroskopija na nivoju posameznih žil omogoča nov vpogled v mehanizme vaskularne modifikacije, povzročene z elektropermeabilizacijo	
		ANG	Intravital microscopy at the single vessel level brings new insights of vascular modification mechanisms induced by electropermeabilization	
	Opis	SLO	Dovajanje električnih pulzov tkivom (mišici in tumorjem) in vivo poleg povečanja permeabilnosti celic povzroči tudi spremembe v krvnem pretoku ter prepustnosti žilne stene za različne makromolekule. Pokazali smo, da električni pulzi, ki se uporabljajo pri elektrokemoterapiji (ECT), povzročijo takojšnje zmanjšanje premera žil, tako arterij kot ven. Posledično nastopi v predelu, ki je bil izpostavljen električnim pulzom, začasna zapora žilja, ki je vidna kot upočasnjeno polnjene žil s fluorescenčno označenimi makromolekulami. Ravno tako električni pulzi, ki se uporabljajo za ECT, povzročijo povečanje permeabilnosti stene žil za makromolekule različnih velikosti (20, 70, 2000 kDa). Ravno tako smo pokazali, da je povečanje permeabilnosti različno za različno velike molekule, ter da traja povečana permeabilnost žilnih sten približno 30 minut po dovedenih električnih pulzih. Članek je bil tudi izpostavljen na naslovnici revije Journal of Controlled Release.	
		ANG	Electroporation-electropermeabilization, i.e. the result of the application of electric pulses to tissues, is a physical method for delivery of exogenous molecules into cells. It is effective particularly for compounds with limited transmembrane transport. In vivo, electropermeabilization facilitates the delivery of chemotherapeutic drugs into tumor cells that is the basic mechanism of the antitumor effectiveness of electrochemotherapy. This therapy has also blood flow modifying effects in tissues. The aim of our present study was to understand and explain the effects of electropermeabilization on the dynamics (vasomotricity, permeability and recovery) of subcutaneous blood vessels towards different size of molecules. These features were measured in C57Bl/6 mice via a dorsal skin fold window chamber, using fluorescently labeled dextrans of different sizes, intravital fluorescence microscopy imaging and specific image analysis. Application of electric pulses on the skin in vivo resulted in a rapid increase in vascular permeability that gradually recovered to basal levels at different times post-treatment, depending on dextran size. Simultaneously, the immediate constriction of the blood vessels occurred that was more pronounced for arterioles compared to venules. This vasoconstriction of arterioles results in a transient vascular lock. The increased permeability of small vessels walls whatever the dextran size associated with delayed perfusion explains the improved delivery of the intravenous injected molecules (i.e. drugs, gene delivery) into the tissues induced by electropermeabilization in vivo.	
	Objavljeno v	Elsevier; Journal of controlled release; 2012; Vol. 163, iss. 3; str. 396-403; Impact Factor: 7.633; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.729; A': 1; WoS: DY, TU; Avtorji / Authors: Bellard Elisabeth, Markelc Boštjan, Pelofy Sandrine, Le Guerroué François, Serša Gregor, Teissie Justin, Čemažar Maja, Golzio Muriel		
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		
COBISS ID		1530491	Vir: COBISS.SI	
Naslov	SLO	Magnetofekcija: ponovljiva metoda za vnos genov v melanomske celice		
	ANG	Magnetofection : a reproducible method for gene delivery to melanoma cells		
		Magnetofekcija je z nanodelci posredovana metoda transfekcije celic, tkiv in tumorjev. Superparamagnetni železo-oksadni nanodelci (SPIONs) so zanimivi kot dostavni sistem za terapevtske gene. Magnetofekcija je bila že		

Opis	SLO	<p>opisana v pomembnih študijah; a kakorkoli, potrebno je izdelati natančen protokol sinteze SPIONs za njihovo širšo uporabnost. V naši raziskavi smo preverili vpliv spreminjanja različnih parametrov v postopku sinteze s koprecipitacijo v alkalnem mediju na fizikalno-kemijske lastnosti SPIONs. Rezultati so pokazali, da čas shranjevanja soli železovega(II) sulfata, vrsta prečiščene vode in temperatura sinteze nimajo vpliva tako na fizikalno-kemijske lastnosti sintetiziranih SPIONs kot tudi posledično na uspešnost magnetofekcije. Vendar pa je za učinkovito izražanje genov, ki jih kodira plazmidna DNA, predvsem pomembna funkcionalizacija SPIONs-PAA (SPIONs stabilizirani s poliakrilno kislino) z vodno raztopino polietilenimina (PEI), katere pH naj nebi bil uravnan z alkalnega na fiziološki. Če povzamemo rezultate, je sinteza SPIONs s koprecipitacijo soli železovega (II) in železovega(III) sulfata v alkalnem mediju, sledeča stabilizacija SPIONs s PAA in funkcionalizacija s PEI ter končna vezava plazmidne DNA, robustna metoda, ki posledično omogoča ponovljivo in učinkovito magnetofekcijo. Za uspešno izražanje genov pa je pomemben pH vodne raztopine PEI za funkcionalizacijo SPIONs-PAA, ki naj bi bil v alkalnem območju.</p>
	ANG	<p>Magnetofection is a nanoparticle-mediated approach for transfection of cells, tissues, and tumors. Specific interest is in using superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as delivery system of therapeutic genes. Magnetofection has already been described in some proof-of-principle studies; however, fine tuning of the synthesis of SPIONs is necessary for its broader application. Physicochemical properties of SPIONs, synthesized by the co-precipitation in an alkaline aqueous medium, were tested after varying different parameters of the synthesis procedure. The storage time of iron(II) sulfate salt, the type of purified water, and the synthesis temperature did not affect physicochemical properties of SPIONs. Also, varying the parameters of the synthesis procedure did not influence magnetofection efficacy. However, for the pronounced gene expression encoded by plasmid DNA it was crucial to functionalize poly(acrylic) acid-stabilized SPIONs (SPIONs-PAA) with polyethyleneimine (PEI) without the adjustment of its elementary alkaline pH water solution to the physiological pH. In conclusion, the co-precipitation of iron(II) and iron(III) sulfate salts with subsequent PAA stabilization, PEI functionalization, and plasmid DNA binding is a robust method resulting in a reproducible and efficient magnetofection. To achieve high gene expression is important, however, the pH of PEI water solution for SPIONs-PAA functionalization, which should be in the alkaline range.</p>
	Objavljeno v	Hindawi Pub. Co.; BioMed research international; 2013; Vol. 2013; Impact Factor: 2.706; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.947; WoS: DB, QA; Avtorji / Authors: Prosen Lara, Prijič Sara, Mušič Branka, Lavrenčak Jaka, Čemažar Maja, Serša Gregor
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

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

Družbeno-ekonomski dosežek			
1.	COBISS ID	276073728	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vpliv magnetofekcije s plazmidno DNA, ki kodira shRNA proti genu Mcam, na angiogenezo mišjih endotelijskih celic in proliferacijo celic mišjega melanoma in vitro
		ANG	The effect of magnetofection with plasmid DNA encoding shRNA against Mcam of endothelial and proliferation of melanoma murine cells in vitro

	Opis	SLO	Prof. Gregor Serša je bil mentor mladi raziskovalki Lari Prosen, ki je v letu 2014 uspešno zagovarjala doktorsko nalogo z naslovom Vpliv magnetofekcije s plazmidno DNA, ki kodira shRNA proti genu Mcam, na angiogenezo mišjih endotelijskih celic in proliferacijo celic mišjega melanoma in vitro.
		ANG	Tema njenega doktorata je bila optimizacija sinteze superparamagnetnih nanodelcev železovega oksida, oplasnjenih z anionskim polimerom poliakrilno kislino in funkcionaliziranih s kationskim polimerom polietileniminom za uporabo pri magnetofekciji. Določala je učinkovitost magnetofekcije s pripravljenim terapevtskim plazmidom, ki kodira shRNA proti genu Mcam, na celicah in vitro in tumorjih in vivo.
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom	
	Objavljeno v	[L. Prosen]; 2014; XVIII, 99 f.; Avtorji / Authors: Prosen Lara	
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija	
2.	COBISS ID	1742203	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Genska elektrotransfekcija iz predklinike v kliniko
		ANG	Gene electrotransfer from bench to bedside
	Opis	SLO	Prof. Gregor Serša je bil vabljen kot predavatelj na srečanju How electroporation based therapies have reached clinical trials and standard of care, ki je potekalo na Copenhagen University Hospital Herlev, 28.3.2014. Kopenhagen. Naslov predavanja je bil Genska elektrotransfekcija iz predklinike v kliniko: genska terapija raka z inhibitorjem integrinov oz. plazmidom AMEP.
		ANG	Gene electrotransfer from bench to bedside : cancer gene therapy using the integrin inhibitor AMEP plasmid : an invited lecture at meeting How electroporation based therapies have reached clinical trials and standard of care, Copenhagen University Hospital Herlev, 28. 3. 2014, Copenhagen. Copenhagen, 2014.
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
Objavljeno v	2014; Avtorji / Authors: Serša Gregor		
Tipologija	3.16 Vabljen predavanje na konferenci brez natisa		
3.	COBISS ID	266440192	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Organizatorji znanstvene konference o eksperimentalni in translacijski onkologiji in uredniki znanstvene konference o eksperimentalni in translacijski onkologiji
		ANG	Co-organizer of scientific conference on experimental and translational oncology
Opis	SLO	Prof. Gregor Serša in prof. Maja Čemažar sta bila soorganizatorja 7. Konference o eksperimentalni in translacijski onkologiji in urednika Book of abstracts of the 7th Conference on experimental and translational oncology. Konferenca združuje slovenske znanstvenike, ki delujejo na tem področju.	

		Konference se udeležuje tudi veliko število tujih predavateljev.
	ANG	Prof. Gregor Sersa in prof. Maja Cemazar were co-organizer of the 7th conference on experimental and translational oncology and editors of Book of abstracts of the 7th Conference on experimental and translational oncology. The conference brings together Slovenian scientists working in this field. The conference is also attended by a large number of foreign lecturers.
	Šifra	B.01 Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v	Association of Radiology and Oncology; 2013; 216 str.; Avtorji / Authors: Serša Gregor, Kos Janko, Lah Turnšek Tamara, Čemažar Maja, Filipič Metka, Kranjc Simona, Markelc Boštjan
	Tipologija	2.25 Druge monografije in druga zaključena dela
4.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO Evropski laboratorij na področju elektroporacije: LEA-EBAM
	ANG	The European associated laboratory "pulsed electric fields application in biology and medicine" LEA-EBAM
	Opis	<p>SLO</p> <p>LEA "EBAM" je sestavljen iz naslednjih laboratorijev:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Physical Vectorology team of the Laboratory of Vectorology and Antitumor Therapies (VAT), UMR 8203 (CNRS – Institut Gustave Roussy – Université Paris Sud 11), directed by Dr Lluís M. MIR;</li> <li>• Cell Biophysics team of the Laboratory of Pharmacology and Structural Biology (IPBS), UMR 5089 (CNRS – and University of Toulouse III) directed by Pr. JeanPhilippe GIRARD;</li> <li>• Theoretical Chemistry and Biochemistry team of the Laboratory of Structure and Reactivity of the Complex Molecular Systems (SRSMC), UMR 7565 (CNRS and University HenriPoincaré, Nancy I) directed by Pr. Yves FORT;</li> <li>• Bioelectrophenonics group of the Laboratory XLIM (XLIM), UMR 6172 (CNRS; and University of Limoges), directed by Dr Dominique CROS;</li> <li>• Department of Biomedical Engineering (LBK) Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, directed by Pr Damijan MIKLAVCIC;</li> <li>• Department of Experimental Oncology (EON) of the Institute of Oncology, Ljubljana, directed by Pr Gregor SERSA.</li> </ul> <p>Glavni namen skupnega raziskovanja je izboljšati temeljno znanje o elektroporaciji, izboljšati zdravljenja in opremo, ki se uporablja na osnovi elektroporacije (elektrokemoterapija in elektro gensko zdravljenje), širiti znanje na tem področju.</p>
	ANG	<p>The LEA "EBAM" consists of the following teams:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Physical Vectorology team of the Laboratory of Vectorology and Antitumor Therapies (VAT), UMR 8203 (CNRS – Institut Gustave Roussy – Université Paris Sud 11), directed by Dr Lluís M. MIR;</li> <li>• Cell Biophysics team of the Laboratory of Pharmacology and Structural Biology (IPBS), UMR 5089 (CNRS – and University of Toulouse III) directed by Pr. JeanPhilippe GIRARD;</li> <li>• Theoretical Chemistry and Biochemistry team of the Laboratory of Structure and Reactivity of the Complex Molecular Systems (SRSMC), UMR 7565 (CNRS and University HenriPoincaré, Nancy I) directed by Pr. Yves FORT;</li> <li>• Bioelectrophenonics group of the Laboratory XLIM (XLIM), UMR 6172 (CNRS; and University of Limoges), directed by Dr Dominique CROS;</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Department of Biomedical Engineering (LBK) Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, directed by Pr Damijan MIKLAVCIC;</li> <li>• Department of Experimental Oncology (EON) of the Institute of Oncology, Ljubljana, directed by Pr Gregor SERSA.</li> </ul> <p>The main aim of the LEA to enhance our understanding on the mechanisms of classical electropermeabilization, contribute to a better and safer implementation of the electropermeabilizationbased applications, and to the development of new applications, to develop new approaches like treatment planning in existing applications, such as antitumor electrochemotherapy and in vivo gene transfer for therapeutic purposes and to disseminate the knowledge and the applications in the scientific community and in the society.</p>	
Šifra	D.02	Ustanovitev raziskovalnega centra, laboratorija, študija, društva	
Objavljeno v	Spletna stran <a href="http://lbk.fe.unilj.si/project_si.html">http://lbk.fe.unilj.si/project_si.html</a>		
Tipologija	2.14 Projektna dokumentacija (idejni projekt, izvedbeni projekt)		
5.	COBISS ID	1485947	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Translacijske raziskave v biomedicinskih aplikacijah elektroporacije	
	ANG	Translational research in biomedical applications of electroporation	
Opis	SLO	Prof. Serša je v letu 2013 predaval na številnih domačih in tujih konferencah. Navedeno predavanje je eno odmevnejših vabljenih predavanj.	
	ANG	In year 2013 prof. Serša had several lectures at domestic and international conferences. This lecture was one of the most notable invited lectures.	
Šifra	B.04	Vabljeno predavanje	
Objavljeno v	International Society of Electrochemistry & Bioelectrochemical Society; Program & book of abstracts of Bioelectrochemistry 2013; 2013; Str. 91; Avtorji / Authors: Serša Gregor		
Tipologija	1.10	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljeno predavanje)	

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

Prof. Serša in prof. Čemažarjeva aktivno opravljata tudi v pedagoško delo na Univerzi v Ljubljani in Univerzi na Primorskem, kjer predavata na dodiplomskem in podiplomskem študiju. Poleg tega sta mentorja tudi dodiplomskih študentom različnih smeri (radiološka tehnologija, zdravstvena nega, biologija) ter študentom magistrskega in doktorskega študija.

Prof. Serša in prof. Čemažarjeva sta tudi urednika mednarodne revije *Radiology and Oncology*, ki izhaja v angleškem jeziku in katere kvaliteta se vsako leto izboljšuje. Revija je uvrščena v mednarodne baze "SCOPUS", "Web of Science" in "PubMed". Leta 2011 je dobila tudi svoj faktor vpliva.

Podiplomska študentka Maša Bošnjak, je imela pod mentorstvom prof. Serše predavanje z naslovom *Gene electrotransfer as a delivery method for anti-angiogenic cancer therapy* na tuji univerzi Old Dominion University, Frank Reidy Research Center for Bioelectrics v Norfolku v Združenih državah Amerike.

Doktor Tanja Dolinšek je imela pod mentorstvom prof. Čemažarjeve predavanje z naslovom *Delivery of siRNA against endoglin into murine mammary adenocarcinoma prevents angiogenesis and delays tumor growth* na 7. mednarodnem kongresu Conference on

Experimental and Translational Oncology v Portorožu v Sloveniji.

Raziskovalci programske skupine so se vključili v COST program TD 1104, kjer delujemo na področju bazičnih mehanizmov elektroporacije in kliničnih aplikacij.

Oddelek za eksperimentalno onkologijo se je povezal v virtualni laboratorij biomedicinskih aplikacij elektroporacije s francoskimi partnerji LEA EBAM.

V preteklem letu smo se vključili tudi v konzorcij Bioelectrics, kjer sodelujejo tudi partnerji iz ZDA in Japonske poleg evropskih partnerjev.

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>8</sup>

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

SLO

Večina antiangiogenih terapij, ki se uporabljajo v klinični praksi, temelji na zaviranju signalnih poti vaskularnega endotelnega rastnega faktorja. S tovrstnimi terapijami so povezani hudi neželeni učinki ter neobčutljivost določenih vrst tumorjev. Zato se iščejo nove tarče, ki bi bile neodvisne od vaskularnega endotelnega rastnega faktorja. Tako smo se v projektu osredotočili na tri nove tarčne molekule, in sicer endoglin (CD105), celično adhezijsko molekulo melanoma (CD146/MCAM) in integrine. Endoglin je koreceptor transformirajočega rastnega faktorja in se izraža zelo specifično samo v aktiviranih tumorskih endotelnih celicah, zato predstavlja potencialno in izredno primerno tarčo, saj aktivira endotelne celice po signalni poti, ki je neodvisna od endotelnega rastnega faktorja. Molekula CD146 ima pomembno vlogo pri razvoju melanoma in njegovem napredovanju, vključno z invazijo, metastatskim potencialom ter angiogenezo, zato predstavlja potencialno tarčo pri genski terapiji melanoma, katerega incidenčna in umrljivostna stopnja se povečujeta. Z vezavo proteina AMEP na tarčna integrina  $\alpha 5\beta 1$ , ki se izraža na melanomskih celicah, in  $\alpha v\beta III$ , ki se izraža na aktiviranih endotelnih celicah, bi zavrla njuno delovanje in tako povzročili protitumorski in antiangiogeni učinek. Za ciljanje CD105 in CD146 smo uporabili nov pristop v molekularni biologiji, in sicer RNA interferenco. Pripravili smo povsem novi plazmidni DNA, eno ki kodira shRNA proti CD105 in drugo ki kodira shRNA proti CD146. Integrine pa smo ciljali s proteinom AMEP, ki ga je kodiral plazmid AMEP.

Kar se večina kliničnih študij genske terapije poslužuje virusnih dostavnih sistemov, smo se v projektu zaradi varnosti odločili za razvoj nevirusnih. Za vnos plazmidov v celice in tumorje smo uporabili elektroporacijo, ki je že razvita in optimizirana metoda, in magnetofekcijo, ki še ni tako razvita metoda.

Tako smo testirali antiangiogeni in protitumorski učinek na celičnih kulturah in tumorskih modelih po genskem elektrotransnosu in magnetofekciji s plazmidi, ki so specifični za tri nove tarče. Pokazali smo, da so terapije izvedljive, učinkovite, specifične in brez neželenih učinkov.

Rezultati raziskav v okviru projekta predstavljajo doprinos k uveljavitvi antiangiogene genske terapije, ki bi lahko bila v prihodnosti uporabljena v kombinaciji z radioterapijo ali standardnimi citotoksičnimi zdraviljenji raka, saj bi zavirala rast tumorjev in razvoj malignega fenotipa. Doprinesli smo tudi k razvoju magnetofekcije, saj se je v in vivo poskusih izkazala kot učinkovita, neinvazivna in neboleča nevirusna metoda vnosa genskega materiala v tumorje, in ima zagotovo visok potencial za nadaljnje študije in prenos v klinično prakso. Z uporabo novejših molekularno bioloških tehnik, t.i. interferenčne siRNA tehnologije, ki uravnava izražanje genov na post-transkripcijski ravni za mRNA, smo doprinesli k njeni izboljšavi in k morebitni prihodnji dopolnitvi pristopov genske terapije. Vse tri raziskovane molekule, CD105, CD146 in integrini, so se izkazale za potencialne tarče, proti katerim je smiselno še naprej razvijati ciljne terapije.

ANG

The majority of anti-angiogenic therapies used in clinical practice is based on the inhibition of signaling pathways of vascular endothelial growth factor. These therapies are related to severe side effects and resistance of certain types of tumors. Therefore, there is a need on searching for new targets, which would be independent of the vascular endothelial growth factor. This project was focused on three new target molecules, namely endoglin (CD105), melanoma cell adhesion molecule (CD146 / MCAM), and integrins. Endoglin is a co-receptor of transforming growth factor  $\beta$  and is expressed in specific activated endothelial cells in tumors, which can be

activated by the vascular endothelial growth factor-independent signaling pathway, and therefore represents a potential and very suitable target. CD146 plays an important role in the development of melanoma and its progression, including invasion, angiogenesis, and metastatic potential, and therefore represents a potential target for gene therapy of melanoma, which incidence and mortality rate are increasing. Binding of protein AMEP on targeted  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha V\beta III$  integrins, which are expressed on melanoma and activated endothelial cells, respectively, would inhibit their function and thus result in antitumor and antiangiogenic effectiveness.

For targeting CD105 and CD146 we used a new approach in molecular biology, namely RNA interference. We have constructed new plasmids, one encoding shRNA against CD105 and another encoding shRNA against CD146. Integrins were targeted by AMEP protein, encoded by a plasmid AMEP.

The majority of gene therapy clinical trials utilize viral delivery systems and due to the safety issues we decided for developing of non-viral ones. For the introduction of plasmids into the cells and tumors electroporation as already developed and optimized method, and magnetofection as a developing method were used. Thus, we tested the anti-angiogenic and anti-tumor effect in cell cultures and tumor models after gene electrotransfer and magnetofection with plasmids, designed specifically for targeting new therapeutic targets. We have demonstrated that the therapies are feasible, effective, specific and without side effects.

The results obtained from the project contribute to the implementation of anti-angiogenic gene therapy, which could be in the future used in the combination with radiotherapy or standard cytotoxic cancer therapies because it would hinder the growth of tumors and the development of a malignant phenotype. We have also contributed to the development of magnetofection, as in vivo experiments demonstrated magnetofection as an effective, non-invasive and painless non-viral gene delivery method into tumors, and it certainly has a high potential for further studies and translation into clinical practice. By using recently developed molecular biology technique, such as siRNA interference technology, which regulates gene expression at the post-transcriptional level of mRNA, we have contributed to its improvement and potential future upgrade of gene therapy approaches. All three studied molecules, CD105, CD146 and the integrins, have proved to be potential targets, against which targeted therapies are worth developing.

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

*SLO*

Razvoj antiangiogene genske terapije je relativno nov in še ne popolnoma razvit pristop zdravljenja raka tako v svetu kot tudi v Sloveniji. Raziskava na novih tarčah za antiangiogeno terapijo je bila nujna, saj imajo dosedanje uveljavljene antiangiogene terapije veliko neželenih stranskih učinkov, zato so nove tarče, ki bi delovale po drugih signalnih poteh, potrebne. Raziskave na področju genskega elektro prenosa in magnetofekcije so tako doprinesle k razvoju tudi drugih pristopov, ki temeljijo na nevirusnem prenosu genov v tarčne celice in tumorje. Z optimizacijo in uporabo magnetofekcije v raziskavi, pa smo doprinesli nova znanja relativno mlademu področju biomedicinske nanotehnologije, kar je pomembno ne le za Slovenijo, temveč tudi v svetovnem merilu.

V projekt so bili vključeni mladi raziskovalci iz Univerze v Ljubljani, ki so spoznavali in se učili novih pristopov genske terapije raka, bazičnega znanja na tem področju, priprave in gojenja ter izolacije plazmidov, različnih testov na celičnih kulturah in tumorskih modelih za določanje protitumorskega in antiangiogenega učinka, ter določanja mehanizmov delovanja terapij.

*ANG*

Anti-angiogenic gene therapy is relatively new approach for cancer treatment worldwide. A research on new targets for anti-angiogenic therapy was necessary, as so far established anti-angiogenic therapies have many side effects and targets involved in other signaling pathways are required. A research in the field of gene electrotransfer and magnetofection contributed in the development of other non-viral approaches for gene delivery into target cells and tumors. By optimizing the use and investigating magnetofection, we contributed to the knowledge of relatively young field of biomedical nanotechnology, which is important not only for Slovenia, but also in the world.

The project also involved young PhD researchers from the University of Ljubljana, who learned

new approaches of cancer gene therapy, gained also on the basic knowledge in this field, learned the preparation, bacterial cultivation and isolation of plasmids, learned different tests on cell cultures and tumor models for the determination of anti-tumor and anti-angiogenic effect, and examined the therapy mechanisms.

#### 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>Spособnost 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"/>
	<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"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<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"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljaljskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine</b>	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<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"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<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**

	<b>Vpliv</b>	<b>Ni vpliva</b>	<b>Majhen vpliv</b>	<b>Srednji vpliv</b>	<b>Velik vpliv</b>	
<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="text"/>	<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="text"/>	<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>					
	Informacijsko-komunikacijska					

G.07.01.	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>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.09.</b>	<b>Drugo:</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

**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**

Doktorica Tanja Dolinšek je v času statusa mlade raziskovalke dosegla izjemni znanstveni dosežek na področju antiangiogene genske terapije s kratkimi nekodirajočimi siRNA molekulami proti endoglinu (CD105). Rezultate raziskovalnega dela je objavila v znanstvenem članku z naslovom »Multiple delivery of siRNA against endoglin into murine mammary adenocarcinoma prevents angiogenesis and delays tumor growth.«, ki je bil sprejet v objavo leta 2013 v ugledno revijo PloS one s faktorjem vpliva 3.534 za leto 2013.

**13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek**

Prof. Serša je tekom raziskovalnega projekta predaval na številnih domačih in tujih konferencah. Eno od njegovih odmevnih vabljenih predavanj je bilo na srečanju 12th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry & XXII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, ki je potekalo marca 2013 v Bochumu v Nemčiji. Prof. Serša je tam predstavil predavanje z naslovom Translacijske raziskave v biomedicinskih aplikacijah elektroporacije.

## 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:*

ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA

Gregor Serša

### ŽIG

Kraj in datum: 

Ljubljana	12.3.2015
-----------	-----------

### Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/77

<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

CB-DE-AB-F3-D5-2E-B8-EC-37-CE-1A-A8-EE-E9-24-48-92-C2-75-0E

## **Priloga 1**

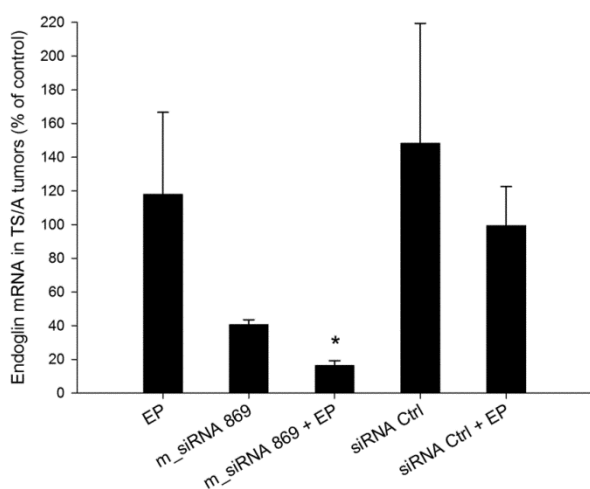


## MEDICINA

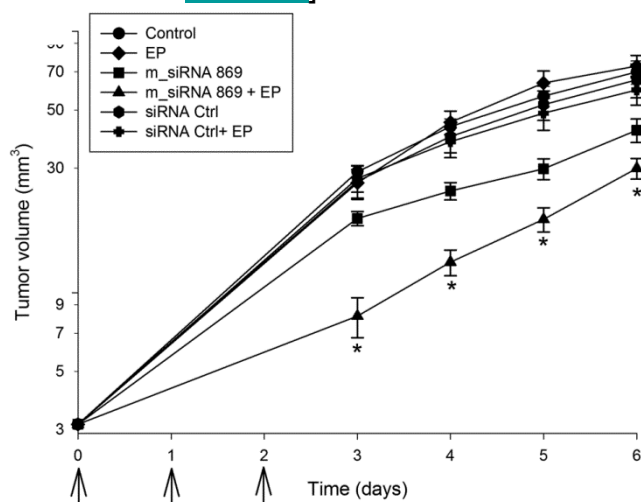
**Področje:** 3.04 - Onkologija

**Dosežek :** Večkratni vnos siRNA proti endoglinu v celice mamarnega adenokarcinoma prepreči angiogenezo in zavre rast tumorjev

*Vir:* DOLINŠEK, Tanja, MARKELC, Boštjan, SERŠA, Gregor, CÖR, Andrej, ŠTIMAC, Monika, LAVRENČAK, Jaka, BROŽIČ, Andreja, KRANJC, Simona, ČEMAŽAR, Maja. Multiple delivery of siRNA against endoglin into murine mammary adenocarcinoma prevents angiogenesis and delays tumor growth. *PloS one*, ISSN 1932-6203, 2013, vol. 8, iss. 3, str. [1-12]. [COBISS.SI-ID [1469819](#)]



3x elektrogenska terapija s siRNA molekulami proti endoglinu je povzročila zmanjšanje količine mRNA endoglina v tumorjih TS/A.



3x elektrogenska terapija s siRNA molekulami proti endoglinu je povzročila zaostanek v rasti tumorjev TS/A.

Endoglin je ko-receptor TGF- $\beta$ , ki sodeluje pri aktivaciji signalne poti, ki omogoča proliferacijo endotelijskih celic in migracijo v angiogenem tumorskem žilju. Utišanje izražanja endoglina zato predstavlja atraktiven pristop za antiangiogeno terapijo tumorjev. Namen raziskave je bil ovrednotiti terapevtski potencial majhnih interferenčnih RNA (siRNA) molekul proti endoglinu *in vitro* v humanih in mišjih endotelijskih celicah in *in vivo* v mamarnem adenokarcinomu TS/A v BALB/c miših.

Rezultati raziskave so pokazali, da imajo siRNA proti endoglinu dober antiangiogeni terapevtski potencial *in vitro*, saj se je učinkovito zmanjšalo izražanje mRNA za endoglin in proteina v mišjih in humanih mikrovaskularnih endotelijskih celicah po lipofekciji in s tem inhibiralo proliferacijo endotelijskih celic in tvorbo žilam podobnih struktur. *In vivo* utišanje endoglina s trojnim elektroprenosom siRNA molekul v mamarni adenokarcinom TS/A učinkovito zmanjša izražanje mRNA, število tumorskih krvnih žil in rast tumorjev.

Dobljeni rezultati kažejo, da je utišanje endoglina obetavna antiangiogena tumorska terapija, ki bi bila uporabna v kombinaciji z že uveljavljenimi citotoksičnimi terapevtskimi pristopi.