

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/137

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

| | |
|--|---|
| Šifra projekta | J2-9770 |
| Naslov projekta | Mehanizmi vnosa DNA pri elektrogenski transpekciji |
| Vodja projekta | 19225 Mojca Pavlin |
| Tip projekta | J Temeljni projekt |
| Obseg raziskovalnih ur | 2.288 |
| Cenovni razred | C |
| Trajanje projekta | 03.2010 - 12.2010 |
| Nosilna raziskovalna organizacija | 1538 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko |
| Raziskovalne organizacije - soizvajalke | 381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta |
| Družbeno-ekonomski cilj | 13. Splošni napredek znanja - RIR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF) |

1.1. Družbeno-ekonomski cilj¹

| | |
|--------------|---------|
| Šifra | 07. |
| Naziv | Zdravje |

2. Sofinancerji²

| | | |
|----|--------|--|
| 1. | Naziv | |
| | Naslov | |
| 2. | Naziv | |
| | Naslov | |
| 3. | Naziv | |
| | Naslov | |

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

Elektrogenska transfekcija se je v zadnjih letih izkazala za najbolj obetavno nevirusno metodo za vnos genskega materiala v biolške celice. Elektrogenska terapija in genska vakcinacija z uporabo električnih pulzov imata velik potencial za zdravljenje avtoimunih in kroničnih bolezni ter raka. Vendar pa mehanizmi vnosa do sedaj še niso popolnoma razjasnjeni.

Za uspešno elektrotransfekcijo genov je bilo do sedaj identificiranih več ključnih korakov: i) permeabilizacija celične membrane, ii) stik plazmidne DNA s celično membrano (tvorba kompleksa DNA-membrana), iii) prehod DNA preko membrane, iv) transport DNA do jedra in v jedro, ter v) izražanje gena. Vendar pa trenutno ne obstaja celovit opis mehanizma vnosa genov na molekularnem nivoju.

Projekt je bil usmerjen v analizo mehanizmov za boljše razumevanje samih procesov ter izboljšanje učinkovitosti genske elektrotransfekcije ter je zajemal eksperimentalno **delo na različnih nivojih kompleksnosti od orjaških fosfolipidnih mehučev, različnih celičnih linijah do 3D in vitro modelih tkiva**, kjer so bile celice vključene v kolagenski matriks. **Interdisciplinarna struktura projektne skupine in ekspertiza vodje projekta iz področji teorije, modeliranja in eksperimentalnih metod** je omogočala, da smo na vseh korakih eksperimentalno delo integrirali s teoretično analizo (analiza elektromobilnosti, intrakcija z membrano) ter uporabili tudi napredno numerično modeliranje z metodo končnih elementov in genetskega algoritma za optimizacijo električnih parametrov in geometrije elektrod v tkivu.

Delo na projektu je bilo sestavljeno iz eksperimentalnega dela na lipidnih mehurčkih, na dveh celičnih linijah in vitro, v kolagenskih gelih, ter iz teoretičnega dela, ki je vsebovalo analitične izračune mobilnosti DNA in numerično modeliranje porazdelitve in optimizacije električnega polja za bolj učinkovito gensko elektrotransfekcijo. Analizirali smo različne parametre, ki vplivajo na učinkovitost elektrogenske transfekcije in vitro: različne kombinacije pulzov, vpliv divalentnih ionov, temperature, korelacija transfekcije z vnosom majhnih molekul in primerjava dveh celičnih linij: transformirane živalske linije CHO in tumorske linije B16. Analizo vpliva različnih kombinacij visoko- (HV) in nizkonapetostnih (LV) pulzov smo hkrati razširili tudi na študijo različnih koncentracij plazmidne DNA.

V prilogi podajamo tudi nekaj reprezentativnih slik in grafov objavljenih in neobjavljenih rezultatov, spodaj pa navajamo opisno glavne zaključke in ugotovitve projekta.

Vpliv koncentracije plazmida na učinkovitost transfekcije z uporabo HV+ LV pulzov – analiza pomena elektroforeze na pritrjenih celicah in celicah v suspenziji
Uporabili smo kombinacijo nizko (LV) in visoko-napetostnih (HV) pulzov. Kot prvi smo z eksperimenti pokazali, da je elektroforetska sila nizkonapetostnih pulzov ključna in vivo pogojih, kjer je pod-optimalna koncentracija plazmidne DNA omejevalni faktor za učinkovito transfekcijo. Pri nizkih lokalnih koncentracijah DNA elektroforetska sila prispeva k boljši interakciji plazmidne DNA s celično membrano in je tako ključna za učinkovito elektrogensko transfekcijo in vivo. **S tem smo tudi pokazali, da je za relevanten prenos zaključkov in metod iz in vitro (laboratorijskih) pogojev v klinično okolje potrebno uporabiti nizke, pod-optimalne koncentracije DNA, kar je pomembno za integracijo znanja laboratorijskih raziskav in kliničnih študij.**

Razvoj naprave, ki omogoča dovajanje različnih kombinacij visoko- (HV) in nizkonapetostnih (LV) pulzov: samo HV, samo LV, LV+HV in HV+LV za vrsto različnih parametrov (N_{HV} , trajanje LV in HV, število HV pulzov, zamik med HV in LV pulzi). Ravno poljubna menjava vrstnega reda obeh tipov pulzov nam bo pomagala dodatno določiti prispevek vsakega puza, ter s tem analizirati mehanizme pomembne za

učinkovito transfekcijo. **Naprava predstavlja edinstven prototip v svetovnem merilu, ki nam omogoča poskuse, ki jih sicer ni mogoče izvajati.** Potencialno bi lahko z posebno kombinacijo LV in HV pulzov izboljšali učinkovitost vnosa v tkivih.

Analiza vpliva vrstnega reda HV ter LV pulzov – pomen elektroforeze in insercije DNA v membrano

Kot prvi smo poleg kombinacije HV+LV pulzov uporabili tudi LV+HV pulze, za ta namen je bil razviti poseben prototip generatorja električnih pulzov. Ugotovili smo da, je tako vrstni red dovajanja obeh tipov pulzov pomemben prav tako pa časovni zamik med njima. Najbolj optimalna kombinacije je uporaba HV in LV pulza z čim krajšim zamikom, kar kaže na to, da LV pulz ne vpliva samo na kontakt molekul DNA z celično membrano ampak prispeva tudi k fazi insercije DNA v lipidni dvosloj. Z uporabo novo zgrajene naprave - generatorja visoko-napetostnih pulzov, ki smo jo razvili v okviru projekta smo lahko dodatno opazovali tudi kombinacijo LV+HV pulzov za poljubne razmake med pulzoma.

Vizualizacija interakcije DNA – membrane z barvilom TOTO-1

Molekulo DNA smo obarvali s fluorescentnim barvilom TOTO-1 ter dovedli ustrezne električne pulse (samo HV, HV+LV, LV+HV, samo LV) v prisotnosti različnih koncentracije plazmidne DNA (1,5, 10 mikrogramov/ml). S fluorescentnim mikroskopom smo opazovali porast intenzitete fluorescence na celični membrane v minutah po dovanju pulzov. Z analizo slik smo določili intenziteto, ki korelira z količino DNA, nakopičeno na površini celice. DNA opazimo samo na katodni strani celice, saj električni pulzi delujejo na negativno nabito DNA v nasprotni smeri polja. Ugotovili smo da je največja intenziteta DNA na membrane pri dovajanju kombinacije HV in LV pulzov, nekaj manjša pri obrnjeni kombinaciji LV+HV, še manjša pri samo HV pulzih, zanemarljiva pri samo LV pulzih. Intenziteta tudi sorazmerno pada z manjšanjem koncentracije in je komaj opazna pri koncentraciji 1 mikrogram/ml obarvane DNA v mediju.

V sodelovanju s sodelavci iz Francije, inštituta CNRS v Toulousu smo izvedli vizualizacijo vezave DNA na membrane za serijo 8 x 5 ms pulzov (tipično uporabljenih in vivo) ter 4x200 mikrosekundne pulze, ki jih uporabljamo in vitro. Rezultati kažejo na to, da je dolžina pulzov zelo pomembna za nastanek kompleksa na membrani. Podrobna analiza rezultatov je še v teku.

Vpliv koncentracije divalentnih Mg^{2+} ionov na učinkovitost transfekcije in elektropermeabilizacije Mg^{2+} ioni delujejo kot most med negativno nabito membrano in negativno DNA. Ugotovili smo, da s povečevanjem koncentracije Mg^{2+} ionov nad 1 mM uspešnost transfekcije v suspenziji pada, kar lahko razlagamo s pomembnim vplivom divalentnega kationa na topologijo DNA in njeno vezavo na membrano celice. Permeabilizacijo celične membrane smo testirali s pomočjo vnosa propidijevega iodida. Z uporabo fluorescenčnega barvila TOTO-1 smo vizualizirali kompleks DNA-membrana in pokazali jasno korelacijo z koncentracijo Mg^{2+} ionov, z spreminjanjem smeri električnega polja pa smo tudi pokazali, da je pri visokih koncentracijah (pre)močno vezan na membrano.

Ker naj bi dvovalentni kationi, predvsem Mg^{2+} povečali aktivnost encimov (DNAs), ki razgradijo v celico vneseno DNA, smo preučili potencialni vpliv teh encimov na uspešnost genske elektrotransfekcije, vendar smo to hipotezo zavrnili.

Analitična analiza elektromobilnosti DNA za različne protokole električnih pulzov

V okviru teoretičnega dela projekta smo opravili analitične izračune elektroforeze za visoko- in nizko-napetostne pulze, ocenili smo tipičen premik DNA med električnimi pulzi in določili minimalno število molekul DNA v stiku z membrano (nekaj deset), ki je potrebno za učinkovito ekspresijo (priloga). Pokazali smo, da pri nekem številu DNA v

interakciji z membrano (cca. 500) dosežemo nasičnje, večanje števila molekul DNA ne doprinese k večji elektrotransfekciji, saj prihaja do medsebojnega odboja elektronabitih molekul. Zato elektroforeza ključno prispeva k boljši učinkovitosti v razmerah kjer je majhno število DNA v kontaktu (nizke koncentracije), pri visokih koncentracijah pa ni takega pomena. Naše ugotovitve so pomembne za razumevanje procesov in za optimizacijo protokolov in *in vitro* in *in vivo*.

Razvoj ter analiza elektrotransfekcije v 3D kolagenskih gelih z vključenimi celicami

Del raziskovanja je bil osredotočen na razvoj 3-D celičnega modela *in vitro* saj v tkivih, na učinkovitost genske elektrotransfekcije vplivajo tudi struktura tkiva, interakcija DNA s komponentami zunajceličnega matriksa in predvsem zmanjšana mobilnost DNA v zunajceličnem matriksu. Uporabili smo različna tridimenzionalna (3-D) ogrodja, v katerih smo gojili različne celice in vanje skušali z dovajanjem električnih pulzov vnesti DNA. Za študijo genske elektrotransfekcije smo izbrali preprost 3-D kolagenski model, v katerem celice CHO-K1 preživijo, in smo vanje z dovajanjem električnih pulzov uspešno vnesli DNA. Določili smo optimalne koncentracije DNA in optimalno izbiro parametrov električnih pulzov za uspešno gensko elektrotransfekcijo, vzoporedno smo določili tudi elektropermeabilizacijo. Rezultati elektrotransfekcije celic v 3-D modelu so primerljivi z rezultati, pridobljenimi v okolju *in vivo*. Pokazali smo, da z dovajanjem pulzov v različnih smereh izboljšamo uspešnost genske elektrotransfekcije v 3-D modelu.

Sistematična analiza vloge elektro-stimulirane endocitoze

Dosedaj je bilo v literaturi večkrat navedeno, da je možen način prehoda DNA v citoplazmo z elektro-stimulirano endocitozo. V prvem delu naše študije smo razvili protokol, ki omogoča vizualizacijo endocitoze takoj po dovajanju električnih pulzov kot tudi v daljšem časovnem obdobju. Z vrsto poskusov smo pokazali, da lahko opazujemo temperaturne spremembe endocitoze ter tudi opazujemo proces znotraj celične vesikulacije pri izpostavitvi stresu. Ugotovili smo da ni povečanja endocitoze po izpostavitvi električnim pučzom, ki jih uporabljamo za elektrotransfekcijo. Naši rezultati kažejo, da je pravilna hipoteza o translokaciji DNA čez elektropermeabilizirano membrano, kar je pomembno za nadaljnje študije elektrotransfekcije.

Razvoj protokola in analiza elektropermeabilizacije membrane orjaških fosfolipidnih mehurčkov (OFM)

Orjaški mehurčki so poenostavljen model celice, kjer lahko opazujemo vpliv električnega polja na membrano lipidnega dvosloja brez ostalih biloških komponent celice (protein, citoskelet,...) V sodelovanju s sodelavci iz Laboratorija za klinično biofiziko Medicinske Fakultete smo okviru projekta izvedli več eksperimentov, kjer smo dovajali različne sete električnih pulzov in opazovali spremembe na membrani orjaških lipidnih. Razvili smo protokol za opazovanje sprememb v milisekundah po pulzih ter določili parametre električnih pulzov, ki permeabilizirajo membrano mehurčkov. Ugotovili smo da v nekaterih primerih pride dočasne permeabilizacije membrane, včasih ireverzibilnega porušenja integritete membrane. Opazili smo tudi iztekanje snovi iz notranjosti mehurčkov kot tudi endocitozo in eksocitozo (glej prilogo), vendar pa so zaenkrat bili rezultati premalo ponovljivi, da bi nam omogočili vizualizacijo interakcije DNA z membrano. Dodana plazmidna DNA ni vplivala na poskuse. V prihodnosti nameravamo še naprej razvijati metodo za večjo ponovljivost rezultatov, ki nam bo omogočala izvajanje eksperimentov tudi na tem modelskem sistemu.

Primerjava dveh celični linij: CHO in B16F1 ter primerjava pritrjenih celic in celic v suspenziji

Predpogoj za uspešno gensko transfekcijo uporaba električnih pulzov zadostne amplitude, da lahko napetost na celični membrani preseže neko mejno vrednost (Critical Induced Transmembrane Voltage – ITVc), nad katero je membrana prepustna. ITVc je odvisna od

bioloških lastnostih celice kot tudi od različnih velikosti in oblik celic, zato se celice v suspenziji obnašajo drugače kot pritrjene celice. **Nobena od študij dosedaj še ni sistematično analizirala in primerjala rezultate genske elektrotransfekcije , elektropermeabilizacije in ITVc dveh celičnih linij, med pritrjenimi celicami in celicami v suspenziji.** Zato smo sistematično analizirali ter primerjali elektropermeabilizacijo in gensko elektrotransfekcijo dveh celičnih linij B16F1 (celice mišjega melanoma) in CHO (ovarijske celice kitajskega hrčka) na celicah v suspenziji in napritrjenih celicah.

Potrdili smo da je elektropermeabilizacija in zadostna ITV predpogoj za gensko elektrotransfekcijo, vendar pa ni preproste korelacije med deležem elektropermeabiliziranih in transfeciranih celic. Primerjava pritrjenih celic z celicami v suspenziji obeh celičnih linij kaže, da se pritrjene celice obnašajo precej drugače, ter zato celice v suspenziji ne predstavljajo najboljšega modelskega sistema za in vivo eksperimente. Naše ugotovitve so pomembne pri prenosu rezultatov in zaključkov raziskav, izvedenih v in vitro pogojih na klinične študije .

Razvoj metod: - spektrofluometer: z vrsto poskusov smo razvili metodologijo za uporabo spektrofluometrije za določanje učinkovitosti genske elektrotransfekcije na celicah v suspenziji, z vzporednimi poskusi na fluorescenčnem mikroskopu in pretočnem citometru smo pokazali korelacijo rezultatov, pokazali smo da tudi z spektrofluometrijo lahko detektiramo prag elektrotransfekcije – to je pomembno saj smo uvedli novo metodo, ki je preprosta in cenejša kot uporaba pretočnega citometra.

Numerično modeliranje električnega polja in optimizacija za bolj učinkovito gensko elektrotransfekcijo v tkivu

Prvi smo razvili 3-D numerični model za optimizacijo genske elektrotransfekcije in vivo, ter izvedli parametrizacijo in optimizacijo različnih parametrov (lega in orientacija elektrod, višina električnega pulza) za gensko elektrotransfekcijo skeletne mišice. Model upošteva tako dinamične spremembe prevodnosti med dovanjem pulzov kot anizotropne lastnosti mišičnega tkiva. Izračunali smo volumne reverzibilno in irreverzibilno poriranega tkiva.. Rezultati kažejo na to, da je izjemno pomembno kako je smer električnega polja orientirana glede na smer mišičnih vlaken pri večjem številu elektrod. Optimalna je uporaba večjega števila elektrod z relativno velikim medsebojnim razmikom. Model nam bo v prihodnje omogočal analizo vpliva različnih parametrov (lega elektrod, orientacija, napetost,..) kot tudi optimizacijo položaja elektrod za čim bolj učinkovito transfekcijo. Naš model končnih elementov kombiniran z genetskim algoritmom je generičen in ga lahko razširimo tudi na druga tkiva

Rezultati so pomembni za druge raziskovalce in in vivo študije, ter kot vodilo pri izbiri optimalnih parametrov in vivo ter s tem omogočajo razžjo translacijo v klinično okolje.

Povzetek ključnih rezultatov in učinkov raziskovalnega projekta

- Rezultati projekta so bili do sedaj objavljeni v **10 znanstvenih člankih v revijah indeksiranih v SCI** in dosedaj tekom trajanja projekta prejeli že **29 čistih citatov**, trenutno so v recenziji še trije članki, trije pa so v pripravi za objavo
- Rezultati so bili tudi predstavljeni v 22 prispevkih na mednarodnih konferencah (tri predavanja)
- V pripravi je glavna publikacija za revijo Gene Therapy (Nature Publishing Group, IF = 4.8), z naslovom “**New insights into mechanisms involved in gene electrotransfer**”, avtorja Maša Kandušer in Mojca Pavlin, ki bo predstavila nove poglede in razumevanje mehanizmov elektrogenske transfekcije od eksperimentalnega dela do teoretičnega opisa mobilnosti DNA in interakcije s celično membrano, ki smo jih pridobili tekom projekta. Pričakujemo, da bodo naši rezultati zanimivi tako da znanstvenike, ki analizirajo mehanizme in vitro kot tudi

za razikovalce, ki metodo uporabljajo v kliničnem okolju.

- Razvili smo napravo, ki omogoča dovajanje različnih kombinacij visoko- (HV) in nizkonapetostnih (LV) pulzov ter predstavlja edinstven prototip v svetovnem merilu, ki nam omogoča poskuse, ki jih sicer ni mogoče izvajati.
- Pojasnili smo relacijo med ključnimi koraki pomembnimi za učinkovit vnos DNA (elektropermeabilizacij, interakcija z membrano, prehod čez membranov, izražanje proteina), sistematična analiza vseh stopenj elektrotransfekcije pod istimi pogoji omogoča integrirano znanje-povezava z teoretičnimi modeli pa daje še dodatno razumevanje procesov
- Implementacija 3D numeričnih modelov za optimizacij elektrogenske transfekcije v tkivu, ki je ključna za napovedovanje/optimizacijo učinkovitosti v tkivih za realne geometrije.
- Razvoj protokola za učinkovito elektrotransfekcijo v različnih pogojih (celice v suspenziji, pritrjene celice, različne celične linije), ki je odprl možnosti za povezovanje s skupinami iz tujine, aplikacijo nanopulzov za elektrotransfekcijo ter razvoj in testiranje novih naprav -
- Metodološko smo razjasnili relacijo med deležem permeabiliziranih celic, deležem transfeciranih celic in stopnjo intenzitete fluorescence za različne metode (fluorescenčna mikroskopija, pretočni citometer, spektrofluoremeter), to zanje je pomembno za primerjavo različnih študij, ki so običajno izvedene z različnimi metodami, metodološko razumevanje pa omogoča pravilno ovrednotenje relacij med različnimi eksperimentalnimi analizami, kar je pomembno za naše nadaljne študije kot tudi za raziskovalce na tem področju

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Večino nalog in ciljev, ki smo si jih zadali v okviru projekta smo realizirali. Glede na uspešno opravljeno delo smo nekatere dele študije še razširili (vpeljavo 3-D kolagenskih gelov, analiza vpliva magnezijevih ionov, razvoj naprave), nekatere dele pa smo nadomestili (namesto izboljšave algoritma naprave Cliniporator smo se odločili za optimizacijo procesa v tkivu z uporabo numeričnega modeliranja).

Sklop 1

Ugotovili smo, da med vnosom mahnih molekul in vnosom DNA ni preproste korelacije, kar kaže na bolj zapleten proces pri transfekciji kot je samo difuzija. Pokazali smo, da je elektroforeza ključnega pomena v razmerah kjer je koncentracija DNA sub-optimalna. Zato je kombinacija HV + LV pulzov zelo uspešna in vivo, medtem ko v in vitro pogojih, kjer lahko dosežemo visoke koncentracije DNA le-ta ne igra bistvene vloge. Naše ugotovitve kažejo na to, da je ključnih več korakov, med drugim insercija DNA v permeabilizirano celično membrano.

Sklop 2

V sodelovanju z Laboratorijem za klinično biofiziko MF-UL smo izvedli analizo elektroporacije orjaških lipidnih mehurčkov. Ugotovili smo da v nekaterih primerih pride do začasne permeabilizacije membrane. V prihodnosti nameravamo še naprej razvijati metodo za večjo ponovljivost rezultatov, ki nam bo omogočala izvajanje eksperimentov tudi na tem modelskem sistemu.

Uspešno sodelovanje v okviru projekta je odprla nove možnosti za analizo interakcije električnega polja z membranami tako vesiklov kot tudi celic.

Sklop 3

Implementirali smo vizualizacijo interakcije DNA z membrano. Pokazalo se je, da je vizualizacija kompleksov z barvilom TOTO možna za različne nabore pulzov in koncentracije plazmida. Nadalje smo izvedli poskuse tudi za kombinacije HV in LV pulzov kot tudi za analizo interakcije in vpliva magnezijevih ionov na elektrotransfekcijo. V sodelovanju z Laboratorijem za biofiziko FE pripravljamo tudi teoretično analizo "bridging" efekta magnezijevih ionov.

Sklop 4

Izračunali smo elektroforetsko silo, ki delujejo med pulzi, ter ocenili tipične razdalje, ki jih prepotuje DNA v suspenziji in gelih za različne protokole in prametre pulzov. Potrdili smo, da je ključni omejujoči faktor za učinkovito transfekcijo in vivo slaba mobilnost plazmida v tkivu.

Na osnovi obširnih poskusov smo ugotovili, da elektroendocitoza ni mehanizem, ki bi lahko pojasnil proces prehajanja DNA v celico z električnimi pulzi ter, da je mehanizem vnosa translokacija DNA čez permeabilizirano membrano.

Sklop 5

Optimizacijo električnih parametrov za bolj učinkovito elektrotransfekcijo smo izvedeli na dva načina. I) Razvili smo numerične 3D modele, ki omogočajo optimizacijo parametrov (položaj elektrod, naptost, orientacija) za učinkovito elektrotransfekcijo v tkivih. II) Razvili smo 3D in vitro kolagenske gele z inkorporiranimi celicami, ki omogočajo optimizacijo parametrov v modelu, kjer je realna mobilnost plazmidne DNA.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Ni bilo bistvenih odstopanj od predvidenega programa.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

| Znanstveni rezultat | | | |
|---------------------|--------|--|--|
| 1. | Naslov | SLO | Razlaga mehanizmov elektrogenske transfekcije - vloga elektroforeze in formacija kompleksa |
| | | ANG | Description of mechanisms of gene electrotransfer - role of electrophoresis and complex formation |
| | Opis | SLO | Prvi smo pokazali, da je so dolgi električni pulzi in elektroforeza ključnega pomena za učinkovito elektrogensko transfekcijo v razmerah, kjer je koncentracija DNA relativno nizka (npr. in vivo) ter da z uporabo nizkih koncentracij DNA zagotovimo boljšo prenosljivost zaključkov iz in vitro v in vivo okolje. Prvi smo poleg HV+LV protokola uporabili tudi LV+HV pulze. Pokazali smo, da je elektroforetska sila ključna za insercijo DNA v permeabilizirano membrane, predstavljeni rezultati pa so pomembni za razumevanje mehanizmov genske elektrotransfekcije in za izboljšanje protokolov. |
| | ANG | We demonstrated for the first time that electrophoresis is key for the efficient electrogene transfection in cases where plasmid DNA concentrations are relatively low (e.g. in vivo) and that use of low DNA concentrations allows better transfer of conclusions from in vitro to in vivo conditions. We also first used LV+HV and HV+LV pulsing protocols and by this demonstrated that electrophoresis is crucial for insertion into permeabilized cell membrane. Presented results are important for understanding of the mechanisms of electrotransfer and for improvement of the protocols. | |

| | | | |
|--------------|--------------|---------|---|
| | Objavljeno v | | Kandušer M, Miklavcic D, Pavlin M. Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses — An in vitro study. Bioelectrochem 74:265-271,2009 IF = 2.6, citations: 7 Faurie C, Reberšek M, Golzio M, Kandušer M, Escoffre JM, Pavlin M, Teissié J, Miklavčič D, Rols MP. Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. J. Gene Med. 12: 117-125, 2010. IF = 3.1 |
| | Tipologija | | 1.01 Izvirni znanstveni članek |
| | COBISS.SI-ID | | 6679380 |
| 2. | Naslov | SLO | Eksperimentalna analiza vpliva Mg ionov na različne procese gensko elektrotransfekcije |
| | | ANG | Experimental analysis of Mg ions on different steps of electrotransfer |
| | Opis | SLO | Izvedeli smo vrsto eksperimentalnih študij in vitro. Med drugim smo pokazali, da v nasprotju z nekaterimi drugimi študijami ne moremo trditi, da lahko s povečevanjem koncentracije Mg ²⁺ ionov zvečamo uspešnost transfekcije, kar lahko razložimo z vplivom magnezija na obstojnost DNA v citoplazmi in njeno vezavo na membrano celice. Opazili smo tudi povečano permeabilizacijo celic ob povečani koncentraciji Mg ²⁺ ionov, kar jasno kaže na to, da so mehanizmi vnosa pri elektrotransfekciji drugačni kot pri vnosu majhnih molekul. |
| | | ANG | We performed a series of in vitro studies where we showed that there is no direct correlation between increase of Mg ²⁺ ions and transfection efficiency. This is in contrast with some other studies and can be explained by the effect of Mg ²⁺ on stability of DNA in the cytoplasm and its binding to the cell membrane. We also found increased permeabilization of the cells with increased Mg ²⁺ ions, which shows that the mechanisms of transfer for electrotransfection are different from transfer of small molecules. |
| | Objavljeno v | | Haberl S, Miklavčič D, *Pavlin M. Effect of Mg ions on efficiency of gene electrotransfer and on cell electropermeabilization. Bioelectrochemistry 79: 265-271, 2010. IF = 2.6 |
| | Tipologija | | 1.01 Izvirni znanstveni članek |
| COBISS.SI-ID | | 7666260 | |
| 3. | Naslov | SLO | Numerično modeliranje električnega polja in optimizacija za bolj učinkovito gensko elektrotransfekcijo v tkivu |
| | | ANG | Numerical modelling of electric field distribution and optimization for more efficient gene electrotransfer in tissues |
| | Opis | SLO | Prvi smo razvili 3-D numerični model za optimizacijo genske elektrotransfekcije in vivo, ter izvedli parametrizacijo in optimizacijo različnih parametrov (lega in orientacija elektrod, višina električnega pulza) za gensko elektrotransfekcijo skeletne mišice. Izračunali smo volume reverzibilno in irrevrziibilno poriranega tkiva. Naš model končnih elementov kombiniran z genetskim algoritmom je generičen in ga lahko razširimo na druga tkiva. Rezultati so pomembni za druge raziskovalce kot vodilo pri izbiri optimalnih parametrov in vivo. |
| | | ANG | We are first to develop 3D numerical models for optimization of gene electrotransfer in vivo. It is the first study that presents parametrization and optimization of pulse amplitudes and electrode positions (depth of insertion, inter-electrode distance, orientation) for gene electrotransfer in skeletal muscle. We calculate volumes of reversibly and irreversibly electroporated tissue. Our finite-element model combined with genetic algorithms is generic and can be applied to other tissues. The results can be used as a guideline for researchers in selecting optimal parameters for gene therapy. |
| | Objavljeno v | | Županič A, Čorović S, Miklavčič D, Pavlin M. Numerical optimization of gene electrotransfer into muscle tissue. Biomed. eng. online (Online) 2010 IF=1.64 |
| | Tipologija | | 1.01 Izvirni znanstveni članek |
| COBISS.SI-ID | | 8218708 | |
| 4. | Naslov | SLO | Optimizacija protokola in analiza genske elektrotransfekcije v tri-dimenzionalnem kolagenskem gelu |
| | | ANG | Optimization of protocols and analysis of gene electrotransfer in three dimensional (3-D) collagen gels |

| | | |
|--------------|---|---|
| Opis | SLO | Prvi smo analizirali gensko elektrotransfekcijo na celicah vključenih v 3-D kolagenske gele, ki predstavljajo kompleksen sistem podoben realnemu okolju v tkivih. 3-D in vitro modeli tkiva so izjemno pomembni, saj omogočajo načrtovanje in analizo različnih protokolov električnih pulzov. Pokazali smo, da je tudi v takem sistemu elektropermeabilizacija predpogoj za elektrotransfekcijo. Ugotovili smo da so daljši električni pulzi (več ms) mnogo učinkovitejši od relativno kratkih pulzov, ki so lahko učinkoviti in vitro. |
| | ANG | We are first to analyse gene electrotransfer in cells embedded in collagen gels, which represent a complex system similar to realistic environment. 3-D collagen models are very important since they enable us to analyse different protocols. We obtained that also in such 3-D model is electropermeabilization crucial for electrotransfer. We obtained that longer several ms pulses are needed for efficient electrotransfer, while in vitro also short pulses are efficient. |
| Objavljeno v | Haberl S, Pavlin M. Use of collagen gel as a three-dimensional in vitro model to study electropermeabilization and gene electrotransfer. J. Membrane Biol. 236: 87-95, 2010. IF = 2.2 | |
| Tipologija | 1.01 Izvirni znanstveni članek | |
| COBISS.SI-ID | 7803220 | |
| 5. Naslov | SLO | Teoretična in eksperimentalna analiza molekularnega transporta med elektroporacijo |
| | ANG | Theoretical and experimental analysis of molecular transport during electroporation |
| Opis | SLO | Predstavili smo teoretični opis difuzije molekul čez celično membrano. Pokazali smo, da obstoječi teoretični modeli, ki opisujejo nastanek tranzientnih por v membrani, ne zadoščajo za opis dolgoživih por, ki so ključne za uspešno elektrogensko transfekcijo in elektrokemoterapijo. V članku izračunamo delež stabilnih por v odvisnosti od električnega polja in števila pulzov ter pokažemo, da je večje število pulzov ključno za stabilizacijo por, kar se ujema z eksperimenti elektrotransfekcije. |
| | ANG | We describe ion and molecular diffusion during electroporation and show that the process can be explained with two populations of pores. We show that the existing theoretical models, which describe formation of transient pores in the membrane, cannot describe long-lived pores that are key for molecular transport and successful electrogene transfection. We calculate the fraction of the stable pores with respect to the electric field and number of pulses and show that larger number of pulses is vital for the pore stabilization which is in agreement with experiments of electrotransfer. |
| Objavljeno v | Pavlin M, Miklavcic D. Theoretical and experimental analysis of conductivity, ion diffusion and molecular transport during cell electroporation... Bioelectrochem 74: 38-46, 2008. IF=2.38, citations: 7 Pavlin M, Leben V, Miklavčič D. Electroporation in dense cell suspension - theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. Biochim. Biophys. Acta (G) 1770: 12-23, 2007. IF = 2.4, citations: 7 | |
| Tipologija | 1.01 Izvirni znanstveni članek | |
| COBISS.SI-ID | 6443604 | |

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

| | | |
|--|-----|---|
| Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat | | |
| 1. Naslov | SLO | Galvanijeva nagrada Mednarodnega društva za bioelektrokemijo za mlade znanstvenike 2007 |
| | ANG | Luigi Galvani prize of International Bioelectrochemistry Society for young investigators |
| | | Mojca Pavlin je leta 2007 za njeno delo na področju teorij in eksperimentov, ki opisujejo elektroporacijo in vnos molekul z elektroporacijo prejela Nagrado Luigi Galvani za mlade znanstvenike. Nagrado podeljujejo mladim znanstvenikom, ki so se odlikovali v znanosti na področju bioelektrokemije in |

| | | |
|--------------|---|---|
| Opis | SLO | bioenergetike ter so avtorji izvirnih prispevkov na tem področju. Mojca Pavlin je na mednarodni konferenci Bioelectrochemistry (1. - 4. april 2007 v Tolousu, Francija) predstavila tudi plenarno predavanje na otvoritvenem delu kongresa. |
| | ANG | In 2007 Mojca Pavlin received Luigi Glavani prize for young investigators for her contribution in field of electroporation her experimental and theoretical description of molecular transport in biological cells after exposure to electric field. This prize is awarded to young scientists for their contribution in fields of Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Mojca Pavlin also presented her work in international conference Bioelectrochemistry (1. - 4. april 2007, Toulouse, France) as a plenary speaker. |
| Šifra | E.02 Mednarodne nagrade | |
| Objavljeno v | Pavlin M. Theoretical and experimental analysis of diffusion of ions and molecules ... Toulouse, France, 1-4 April 2007. BES 2007. [S. l.]: The Bioelectrochemical Society, 2007, str. 17. | |
| Tipologija | 1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljeni predavanja) | |
| COBISS.SI-ID | 5858388 | |
| 2. Naslov | SLO | Implementacija genske elektrotransfekcije v 3-D kolagenske gele |
| | ANG | Implementation of gene electrotransfer in 3-D collagen gels |
| Opis | SLO | Za izboljšanje učinkovitosti je ključno optimizirati električne pulze na realnih sistemih. Prvi smo dosegli uspešno gensko elektrotransfekcijo na celicah vključenih v 3-D kolagenske gele, ki predstavljajo kompleksen sistem podoben realnemu okolju v tkivih, kjer so celice obdane z izvenceličnim matriksom. 3-D kolagenski modeli izjemno pomembni, saj omogočajo poleg študije osnovnih mehanizmov genske elektrotransfekcije tudi načrtovanje in optimizacijo različnih protokolov električnih pulzov za vnos genov v bolj realnem modelu tkiva, hkrati pa se tudi zmanjša število žrtvovanih živali. |
| | ANG | For more efficient electrotransfer it is crucial to optimize protocols on realistic systems. We are first to achieve successful gene electrotransfer in cells embedded in collagen gels, which represent a complex system similar to realistic environment in tissues where cells are surrounded with extracellular matrix. 3D collagen models are very important since they enable us to study basic mechanisms of electrotransfer as well as to design new optimized protocols. Gel models could also represent important step toward clinical trials, since they reduce the number of sacrificed animals. |
| Šifra | F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin | |
| Objavljeno v | Haberl S, Miklavčič D, Pavlin M. Use of three-dimensional collagen gels to study different parameters of gene electrotransfer. V: XXth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics | |
| Tipologija | 1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci | |
| COBISS.SI-ID | 7082324 | |
| 3. Naslov | SLO | Razvoj generatorja poljubnih kombinacij nizko- in visoko-napetostnih pulzov |
| | ANG | Development of a device for generation of different combinations of low- and high-voltage pulses |
| Opis | SLO | V okviru projekta smo razvili novo napravo za generiranje visoko- in nizko-napetostnih pulzov, ki omogoča generiranje poljubnih kombinacij HV in LV pulzov različne dolžine, amplitude, pavz in števila pulzov. Naša hipoteza je, da bi lahko najprej z dovajanjem elektroforetskega nizko-napetostnega pulza omogočili kontakt med DNA in celično membrano, ter nato dovedli visoko-napetostni elektropermeabilizacijski pulz ter s tem izboljšali učinkovitost transfekcije. Naprava je novost v svetovnem merilu, ki omogoča novo vrsto pokusov, pripravljamo tudi patentno zaščito. |
| | ANG | We specifically designed and developed new high-voltage pulse generator, which enables application of new electroporation protocols such as different combinations of first high low- voltage (LV) and then high-voltage (HV) and pulses for different pulse parameters. Our hypothesis is that by applying first LV pulse contact between DNA and cell membrane is established after which by application of HV pulse electropermeabilization and transfer of DNA is achieved. The device is unique in the world and enables new sets of experiments, also patent application is in preparation. |

| | | | |
|----|--------------|---|--|
| | Šifra | F.06 | Razvoj novega izdelka |
| | Objavljeno v | Pavlin M, Flisar K, Kandušer M. The role of electrophoresis in gene electrotransfer. J. Membrane Biol. 236: 75-79, 2010. Oral presentation on 5th Conference on Experimental and Translational Oncology, Kranjska gora, Slovenia, 2008. Pavlin M, Kandušer M, Miklavčič D. Importance of electrophoretic force for successful gene electrotransfer for suboptimal plasmid concentrations. [COBISS.SI-ID 7031892] | |
| | Tipologija | 1.01 | Izvirni znanstveni članek |
| | COBISS.SI-ID | 7818836 | |
| 4. | Naslov | SLO | Razvoj protokola za vizualizacijo in analizo elektro-stimulirane endocitoze |
| | | ANG | Development of a protocol for visualisation and analysis of electro-stimulated endocytosis |
| | Opis | SLO | Nekatere študije so predlagale, da je elektro-endocitoza mehanizem prehoda DNA v citoplazmo. Analizirali smo ali lahko stimuliramo elektro-endocitozo za električnimi pulzi, ki jih uporabljamo za elektrotransfekcijo. Razvili smo protokol za opzovanje endocitoze z barvilom FM 1-43 FX. Nismo opazili povečane endocitoze niti takoj po aplikaciji pulzov, niti dve uri po elektroporaciji. Naši rezultati kažejo, da elektro-endocitoza ni dominantni mehanizem za elektrotransfekcijo ter da DNA prehaja v celico z translokacijo čez permeabilizirano membrano. |
| | | ANG | Some studies suggest that DNA enters the cell via electro-endocytosis. We analyzed if endocytosis is stimulated by applying electric pulses with electric field strength below and above the threshold electric field. We developed a protocol for observing endocytosis using membrane dye FM 1-43FX. No increase in endocytosis either 20 minutes or even up to two hours after the pulse delivery. Our results suggest that electro-endocytosis is not crucial mechanism for gene electrotransfer and that the hypothesis of DNA entry by translocation through permeabilized membrane is more plausible. |
| | Šifra | F.02 | Pridobitev novih znanstvenih spoznanj |
| | Objavljeno v | PAVLIN, Mojca, KANDUŠER, Maša, PUCIHAR, Gorazd, MIKLAVČIČ, Damijan. The role of electrically stimulated endocytosis in gene electrotransfer. V: BAMIDIS, Panagiotis D. (ur.), PALLIKARAKIS, N. (ur.). XII Mediteranean Conference on Medical and Biological Engineering and computing 2010, May 27-30, 2010, Chalkidiki, Greece. IFMBE proceedings, (IFMBE proceedings, vol. 29). [Heidelberg]: Springer, 2010, str. 679-682, ilustr. | |
| | Tipologija | 1.08 | Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci |
| | COBISS.SI-ID | 7726164 | |
| 5. | Naslov | SLO | Vodenje projektne skupine, mentorstvo študentom |
| | | ANG | Coordination of the project group, mentorship |
| | Opis | SLO | Uspešno vodenje in koordinacija interdisciplinarnega projekta s sodelovanjem Medicinske fakultete na področju biomedicine in biotehnologije. Projekt je poleg interdisciplinarne skupine raziskovalcev (fiziki, biologi in elektrotehniki) vključil tudi dodiplomske in podiplomske študente. S tem imajo možnost dela z najnovejšimi metodami in tehnologijami iz področja biotehnologije in biomedicine. |
| | | ANG | Successful coordination interdisciplinary project in collaboration with the Faculty of Medicine in field of biomedicine. The project group includes interdisciplinary group of researchers (physicists, biologists and electrical engineers) as well as undergraduate and graduate students. This gave the students a chance to participate and use state-of-the-art methods in the biomedicine and biotechnology. |
| | Šifra | D.01 | Vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov |
| | Objavljeno v | PhD supervisor HABERL, Saša. Analiza vpliva različnih parametrov na učinkovitost genske elektrotransfekcije v celičnih kulturah in v in vitro modelu tkiva = Analysis of the influence of various parameters on gene electrotransfer efficiency in cell cultures and in in vitro tissue model : doktorska disertacija. Ljubljana: [S. Haberl], 2011. X, 174 str., ilustr. | |

| | | |
|--------------|---------|-----------------------|
| Tipologija | 2.08 | Doktorska disertacija |
| COBISS.SI-ID | 2987633 | |

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Drugi pomembni dosežki

- Razvoj protokola za elektrotransfekcijo primarnih mišičnih mioblastov: V povezavi s Patofiziološkim inštitutom smo razvili učinkovit protokol za vnos plazmidne DNA v primarne humane mišične celice z metodo genske elektrotransfekcij. Rezultati dela so bili predstavljeni na konferenci "ERK" (september, 2010; Portorož) z naslovom "Comparison of electroporation and lipofection for in vitro transfer of plasmid pEGFP-N1 into human myoblasts".
- Razvoj protokola za kombinacijo "klasičnih" električnih pulzov in nanopulzov za bolj učinkovito elektrotransfekcijo (publikacija v pripravi)
- Analiza vpliva faze rasti celic v kulturi na učinkovitost ekspresije (analiza še v teku)
- Implementacija spektrofluoremetra za analizo elektrotransfekcije MARJANOVIČ, Igor, KANDUŠER, Maša, MIKLAVČIČ, Damijan, PAVLIN, Mojca. Spectrofluorometry - an easy alternative for measuring gene electrotransfection on cells in a suspension. V: Advanced methods in cell biology. Piran: ISS, 2010. http://www.iss-piran.com/images/stories/poster_abstracts2010/marjanovic.pdf. [COBISS.SI-ID 7945556]

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Genska elektrotransfekcija se je v zadnjih letih uveljavila kot nabolj obetavna nevirusna metoda vnosa genov v celice in vitro in in vivo. Najnovejše študije so pokazale, da je tudi idealna metoda za transfekcijo pri genski vakcinaciji, ki ima velik potencial v prihodnosti tudi za zdravljenje raka.

Vendar pa mehanizmi vnosa še niso popolnoma jasni, sam proces elektrotransfekcije pa je težko neposredno opazovati. Glavni namen projekta je bil pojasniti mehanizme pomembne za elektrotransfekcijo na različnih nivojih kompleksnosti of lipidnih mehurčkov, analize elektrotransfekcije in vitro na celičnih linijah do analize in potimizacije parametrov na 3D kolagenskih gelih ter z razvojem numeričnih 3D modelov elektrotransfekcije v tkivih.

Ekperimentalno delo in vitro smo kombinirali z teoretičnim opisom mobilnosti DNA in interakcije z celično membrano. Pridobljeno znanje o mehanizmih pomembnih za elektrotransfekcijo v kombinaciji z numeričnim modeliranjem in optimizacijo v tkivu omogoča optimizacijo protokolov za in vivo elektrogensko terapijo (EGT) in s tem hitrejšo vpeljavo metode v kliniko. Dosedaj so tovrstni modeli obstajali samo za elektrokemoterapijo. Rezultati projekta so podali nova znanstvena spoznanja in so pomembni tudi na mednarodnem nivoju, pridobljena znanja pa lahko tudi omogočajo povezavomed in vitro laboratorijskimi raziskavami in raziskavami na živalih in v klinikah.

Kot eden najpomembnejših rezultatov projekta smo prvi ekperimentalno pokazali, da je elektroforeza ključna za učinkovito gensko elektrotransfekcijo in vivo, kjer je koncentracija plazmidne DNA relativno nizka, medtem ko pri in vitro eksperimentih elektroforeza ni pomembna in zadošča učinkovita elektropermeabilizacija. Prav tako smo pokazali, da je za prenos ugotovitev iz in vitro sistemov v in vivo sisteme potrebno uporabiti suboptimalne koncentracije plazmida v in vitro sistemih oziroma uporabiti in vitro 3D gelski sistem, ki ima podobne lastnosti kot tkivo. Naši rezultati so pomembni tako za razumevanje procesa in mehanizmov genske elektrotransfekcije in vitro in in vivo, kot tudi za izboljšavo eksperimentalnih protokolov.

Ekperimentalne rezultate v okviru projekta smo nadgradili s teoretičnimi izračuni, kar je bilo do sedaj narejeno le v nekaj študijah na tem področju. To je dalo nova spoznanja o poteku genske transfekcije, nova znanja ter možnost razlage ključnih mehanizmov.

Dodatno smo v okviru projekta razvili nov visokonapetostni generator, ki omogoča uporabo različnih kombinacij visoko in nizko napetostnih pulzov z različnimi seti parametrov. Možnost preklopa časovnega zaporedja visoko- in nizko-napetostnih pulzov nam je omogočila specifično

študijo vpliva posameznih tipov pulzov ter iz tega pomen elektroforeze, elektropermeabilizacije ter kontakta med DNA in membrano. Izvirne zmožnosti generatorja omogočajo nove eksperimente in so pomembna konkurenčna prednost pred drugimi laboratoriji. Naši rezultati in ugotovitve so bili do sedaj predstavljeni na več mednarodnih konferencah ter objavljeni v dveh člankih v eni izmed vodilnih revij na področju bioelektrokemije. V pripravi je tudi članek, ki povzema glavne in najnovejše rezultate projekta in bo poslan v eno izmed vodilnih revij na področju genske terapije, rezultati pa so zanimivi za raziskovalce, ki načrtujejo in vitro ter in vivo študije elektrogenske transfekcije in genske vakcinacije ter za širše področje bioelektrokemije.

ANG

Gene electrotransfer has in last years emerged as the most promising non-viral method for transfer of genetic material into biological cell. Recently it was also identified as an ideal method for DNA vaccination, which has show great potential for treatment of cancer. Still, the mechanisms are not fully understood and direct visualization of the process is very difficult. The main focus of this project was elucidating the mechanisms of gene electrotransfer on different level of complexity from giant lipid vesicles, analysis on different cell lines in vitro to analysis and optimization of parametres on collagen gels and with 3D numerical modeling. In vitro experiments were combined with theoretical description of DNA mobility and interaction with the cell membrane. Obtained knowledge of the mechanisms combined with presented 3D numerical modelling of electrotransfection in tissue will enable optimization of parameters of in vivo EGT and faster translation into clinics. Sofar numerical models were applied only for oprimization of electrochmotherapy while for gene no such study existed. The results of the project are important for gaining basic knwoldge of the process as well as to serve as a connection between in vitro and in vivo studies.

We first clearly demonstrated experimentally that electrophoresis is crucial for efficient gene electrotransfer in vivo, where concentration of plasmid DNA is relatively low, while in in vitro environment electrophoresis is not crucial and efficient elektropermeabilization is sufficient. Furthermore, our results showed that if we want to transfer or compare the conclusions from in vitro results in in vivo environment it is crucial that we use sub-optimal plasmid concentrations. This and other results are important for understanding the processes and mechanisms of gene electrotransfer in vitro and in vivo, as well as for improving the protocols.

The experimental results obtained during the course of the project are supported with theoretical calculations, which so far was done only in few studies in this field of research. This provided new insights in the process of gene electrotransfer, new knowledge and possibility to explain involved mechanisms .

Furthermore, we developed new high-voltage pulse generator, which enables us to apply different combinations of high- and low- voltage pulses for different sets of parameters. Possibility to switch the time-course of high- and low- voltage pulses enabled us to specifically study the role of each type of pulse and from this to deduce role of electrophoresis, elektropermeabilization and process of contact between DNA and the cell membrane. This generator represents a unique prototype, which allows us to perform experiments which can not be done in other laboratories.

Our conclusions were so far presented in several international conferences and already published in two papers in one of the leading journals in the field of bioelectrochemistry. In preparation is the publication which will present the most important and newly gained results in one of leading journals in field of gene therapy, and which will be of ineterst for the researchers which design in vitro and in vivo studies of gene therapy and DNA vaccination.

Interdisciplinary project group and combination of theoretical models and experiments enabled us to transfer relevant knowledge from diverse scientific fields. Understanding the mechanisms and development of numerical models for optimization of EGT will enable faster translation into clinics. We expect that our results will be essential to research community which uses EGT for gene therapy and DNA vaccination. The final goal of the principal investigator is to gain knowledge and a range of advanced tools for analysis and application of EGT for different therapeutic targets, which would lead to new treatments.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Projekt je interdisciplinaren in pokriva področje tehnike, biomedicine in biotehnologije. Genska elektrotransfekcija je trenutno najbolj obetavna alternativa virusni transfekciji za uporabo v genski terapiji in genski vakcinaciji. V okviru projekta smo prenesli najnovejšo tehnologijo in znanstvena spoznanja na področju genske elektroterapije v slovensko okolje ter uspešno sodelujemo z raziskovalci iz Francije (CNRS, Toulouse). Naša skupina je ena izmed redkih v svetu, ki uspešno povezuje gensko elektrotransfekcijo in vitro na celičnih linijah ter modelske 3D gelske sisteme, eksperimentalne rezultate pa nadgrajujemo z analitično analizo ter

numeričnim modeliranjem.

Varovanje zdravja

Elektrogenska transfekcija je obetavna metoda, ki omogoča vnos genetskega materiala z uporabo električnih pulzov (brez uporabe virusnih vektorjev) ter tako omogoča varen vnos DNA. Metoda ima velik potencial za uporabo v okviru genske terapije različnih bolezni (avtoimune, kronične) in prve klinične raziskave so že v teku. Razumevanje in izboljšanje metode elektrogenske transfekcije lahko pripomore k hitrejšemu razvoju in uporabi genske terapije brez uporabe virusnih vektorjev, prav tako pa tudi k izboljšanju že obstoječih protokolov za povečanje učinkovitosti elektrogenske transfekcije.

Prenos novih tehnologij v slovensko omogoča prenos novih tehnologij v klinično testiranje V okviru projekta smo prenesli najnovejšo tehnologijo in znanstvena spoznanja na področju genske elektrotransfekcije v slovensko okolje ter sami razvili vrsto protokolov. Na podlagi pridobljenega znanja smo vzpostavili sodelovanje s skupino za Molekularno Nevrobiologijo Medicinske Fakultete UL, z možnostjo tudi širšega povezovanja s partnerji znotraj EU pri implementaciji elektrogenske transfekcije v klinično okolje za elektrogensko terapijo in DNA vakcinacijo

Razvoj novih produktov

Razumevanje mehanizmov elektrogenske transfekcije bo omogočalo razvoj novih protokolov za uporabo metode in vitro ter in vivo. To bo skupaj s pridobljenimi eksperimentalnimi izkušnjami vodilo tudi k nadgradnji obstoječih naprav ter razvoju novih naprav za uporabo v biotehnologiji. V okviru projekta smo razvili tudi novo napravo za generiranje visoko- in nizko-napetostnih pulzov, ki omogoča generiranje poljubnih kombinacij HV in LV pulzov različne dolžine, amplitude, pavz in števila pulzov. Naprava je novost v svetovnem merilu in omogoča sodelovanje z drugimi raziskovalnimi skupinami v Sloveniji in tujini, v pripravi je tudi patentna zaščita.

Prenos naprednih numeričnih metod v biotehnologijo in biomedicino – uspešno smo razvili 3D numerične modele za optimizacijo protokolov genske elektrotransfekcije.

Povezava visokotehnološkega znanja z izobraževalnim sistemom in prenosa v industrijo preko dodiplomskih in podiplomskih predmetov na področju biomedicinske tehnike in biotehnologije. Vodja projekta ter vodji sodelujočih skupin imajo izkušnje z delom v interdisciplinarnih skupinah in so bili mentorji več diplomskih in doktorskim študentom na različnih področjih od elektrotehnike do medicine. Vključenost diplomskih, doktorskih študentov ter podoktorskih raziskovalcev v projekt jim bo omogočila neposreden stik z vrhunskimi biofizikalnimi in biomedicinskimi metodami. Usposabljanje diplomskih in doktorskih študentov za delo na vrhunski tehnologiji ter tesni stiki vodje z industrijo bodo omogočili tudi možnost neposrednega prenosa znanja v industrijo na področju razvoja in aplikacij numeričnega modeliranja ter razvoja in uporabe novih metod in tehnologij.

ANG

The project included interdisciplinary group of Slovenian researchers (physicists, biologists and electrical engineers) and covers fields of technology, biomedicine and biotechnology. Gene electrotransfection itself is currently most promising alternative to the virus transfection for use in gene therapy and DNA vaccination.

Within the project we successfully collaborated with researchers from France (CNRS, Toulouse) and transferred to Slovenia state of the art technology and latest findings in the field of electrogene transfection. We are one of the few groups, which successfully combines experimental gene electrotransfection in vitro on cell lines and model 3D gel systems, and experimental results are upgraded with analytical calculations and numerical modeling.

Health protection

Electrogene transfer is a promising method that allows transfer of genetic material in biological cell by means of electrical pulses. In contrast to viral vector transfer, the use of electric pulses allows safe transfer of DNA. Electrogene transfer has great potential for application in gene therapy for a series of diseases (autoimmune, chronic) and first clinical trials are already under way. Understanding the mechanisms of electrogene transfer will lead to faster development and application of gene therapy without viral vectors, and to improvement of existing protocols, thus increasing efficiency of electrogene transfer.

Establishing new technology in the field of biotechnology and medicine

We successfully transferred new methods and protocols for analysis of gene electrotransfer and developed a series of protocols which enables us state-of-the-art research. Gained knowledge enabled us to establish collaboration with the group of Molecular Neurology (Faculty of Medicine, UL) with possibility of broader collaboration of partners from European Union and implementation of gene electrotransfer in clinical environment.

Development of new products for biotechnology and biomedical engineering with possibility of new EU research projects and cooperation with industry that would encourage development of high-tech industry in the field of biotechnology. This could open also additional connections between Slovenian research institutions and industrial partners from Slovenia and abroad. One of the project activities was also development of new device for generating of high- and low-voltage pulses that also allows generation of arbitrary combination of HV and LV pulses of different amplitudes, lengths, pauses and number of pulses. The device is unique in the world and allows cooperation with other research groups both in Slovenia and internationally, patent is in preparation.

Transfer of advanced numerical methods in biomedicine – we successfully developed 3D numerical models for optimization of gene electrotransfer parameters in tissues

Connection of state-of-the-art knowledge with educational system and knowledge transfer in industry through undergraduate and graduate student courses in the field of biomedical engineering and biotechnology. PI and heads of collaborating groups have extensive expertise in interdisciplinary teams and were mentors of several graduate and doctoral students in different fields from electrical engineering to medicine. Involvement of graduate students, young researchers and postdoctoral researchers in the project enabled them hands-on approach in high-tech biophysical and biomedical methods and also possibility of direct knowledge transfer into industry through development of state-of-the-art numerical modeling and possible new devices. Close collaboration of PI with industry will potentially enable transfer of knowledge of methods/procedures (e.g. solutions for optimization procedures in numerical modeling) into industry.

10. Samo za aplikativne projekte!

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

| Cilj | | |
|-------------|--|---|
| F.01 | Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.02 | Pridobitev novih znanstvenih spoznanj | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.03 | Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.04 | Dvig tehnološke ravni | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.05 | Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja | |

| | | |
|-------------|--|---|
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.06 | Razvoj novega izdelka | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.07 | Izboljšanje obstoječega izdelka | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.08 | Razvoj in izdelava prototipa | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.09 | Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.10 | Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.11 | Razvoj nove storitve | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.12 | Izboljšanje obstoječe storitve | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.13 | Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.14 | Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |

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

| | | |
|-------------|--|---|
| F.24 | rešitev | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.25 | Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.26 | Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.27 | Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.28 | Priprava/organizacija razstave | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.29 | Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.30 | Strokovna ocena stanja | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.31 | Razvoj standardov | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.32 | Mednarodni patent | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.33 | Patent v Sloveniji | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | | |

| | | |
|-------------|-----------------------------|---|
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.34 | Svetovalna dejavnost | |
| | Zastavljen cilj | <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE |
| | Rezultat | <input type="text"/> |
| | Uporaba rezultatov | <input type="text"/> |
| F.35 | Drugo | |
| | 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!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

| | Vpliv | Ni vpliva | Majhen vpliv | Srednji vpliv | Velik vpliv | |
|-------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| G.01 | Razvoj visoko-šolskega izobraževanja | | | | | |
| 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"/> | |
| G.02 | Gospodarski razvoj | | | | | |
| 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"/> | |
| G.03 | Tehnološki razvoj | | | | | |
| 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"/> | |
| G.04 | Družbeni razvoj | | | | | |
| 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"/> | |
| G.05. | Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete | | | | | |
| G.06. | Varovanje okolja in trajnostni razvoj | | | | | |
| G.07 | Razvoj družbene infrastrukture | | | | | |
| 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"/> | |
| G.08. | Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva | | | | | |
| G.09. | Drugo: | | | | | |

Komentar

| |
|--|
| |
|--|

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)

| | | | |
|-----------------|---|--|--------------|
| 1. | Sofinancer | | |
| | 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 | |
| 2. | Sofinancer | |
| | 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 | |
| 3. | Sofinancer | |
| | 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 | |

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, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> 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:

| | | |
|--------------------------------------|----|-------------------------------------|
| Mojca Pavlin | in | |
| podpis vodje raziskovalnega projekta | | zastopnik oz. pooblaščenca oseba RO |

Kraj in datum:

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/137

¹ Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

² Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ 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 (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote. Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁷ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ 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](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

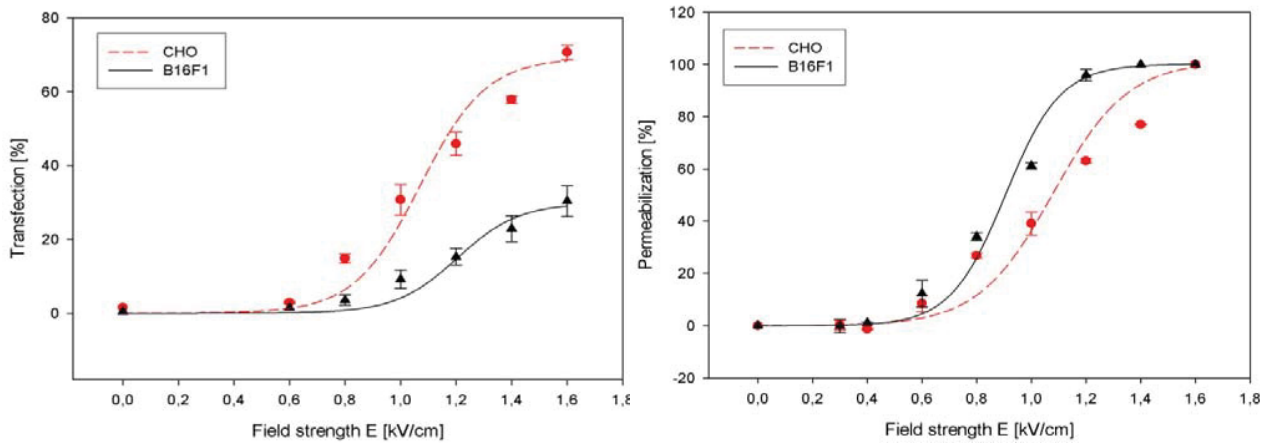
¹¹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Rubrike izpolnite/prepišite 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](#)

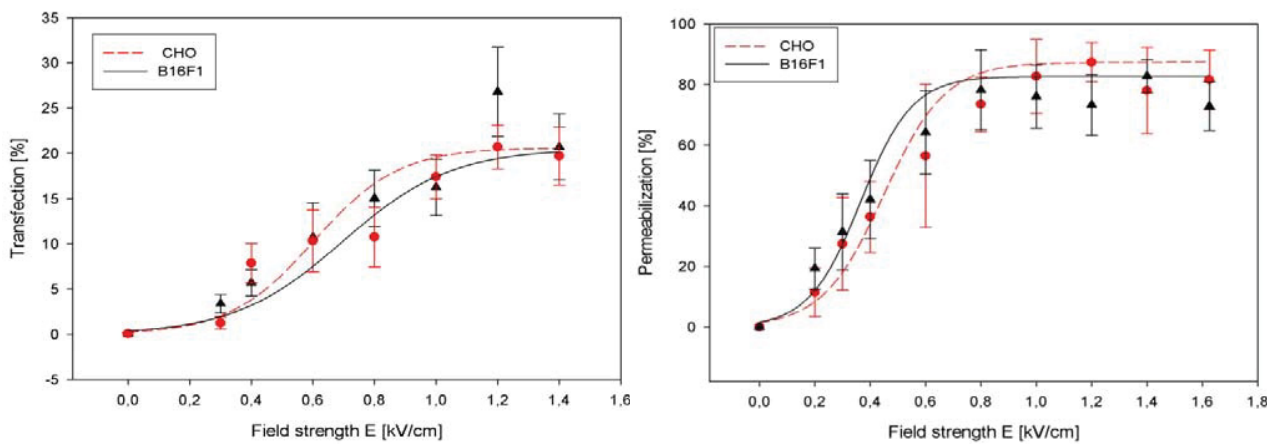
Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01
93-0B-67-45-68-AA-E7-BA-99-83-BA-56-70-79-E7-BB-97-55-EB-E9

Comparison of gene electrotransfer efficiency and electropermeabilization for two cell lines (CHO, B16F1):

Cells in a suspension

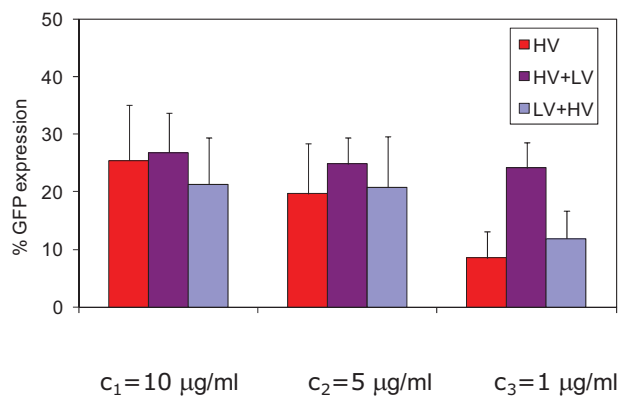


Plated cells



Electrotransfection efficiency (GFP expressing cells) and percentage of electropermeabilized cells for different electric field strengths at plasmid concentration $c_{DNA}=10 \mu\text{g/ml}$. 4HV pulses, 200 μs duration, repetition frequency 1 Hz and different field strengths, were used. Results are presented as a mean with standard error.

Effect of plasmid DNA concentration on electrotransfer efficiency for HV+LV and LV+HV pulses



Priloga- zaključno poročilo J2-9770

The effect of electric pulse protocols on the percentage of CHO cells expressing GFP at different plasmid concentrations. Each bar is a mean of five independent experiments \pm standard deviation.

Effect of Mg^{2+} ions on different steps of gene electrotransfer

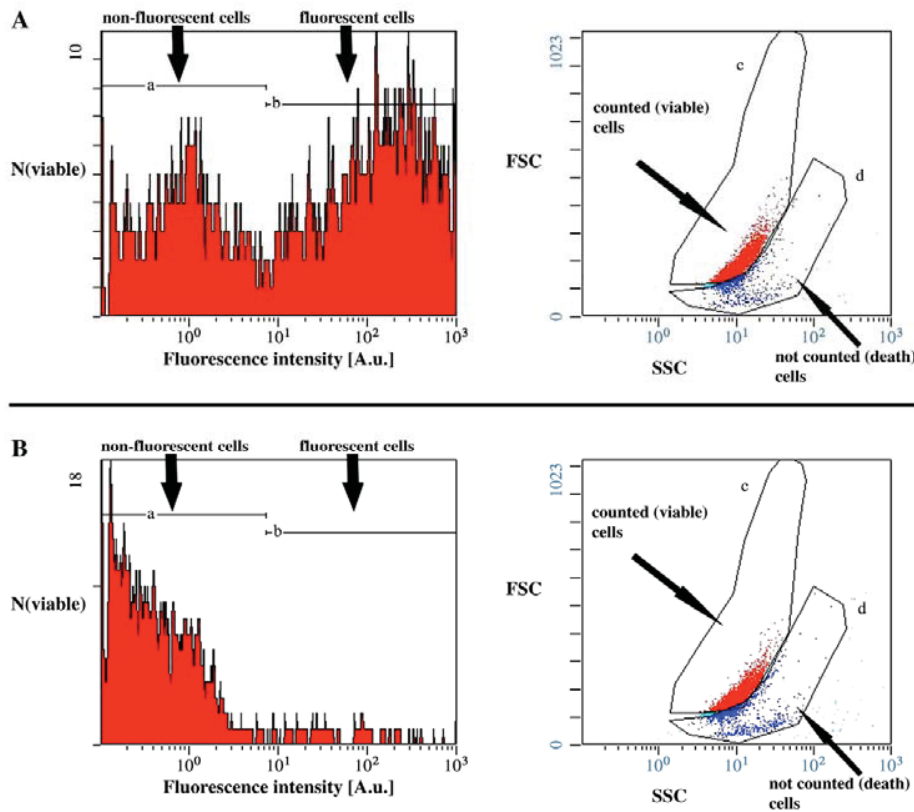
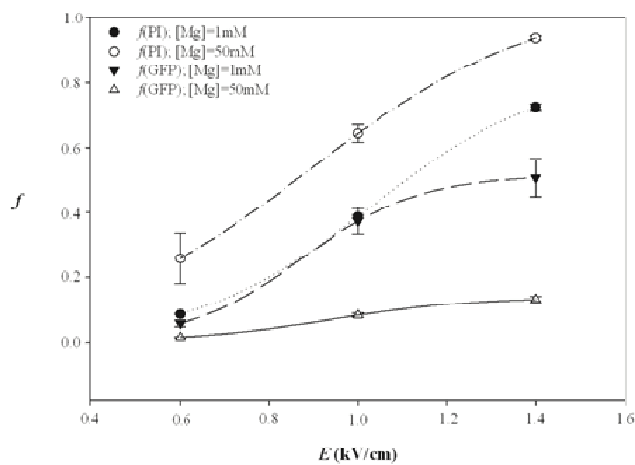
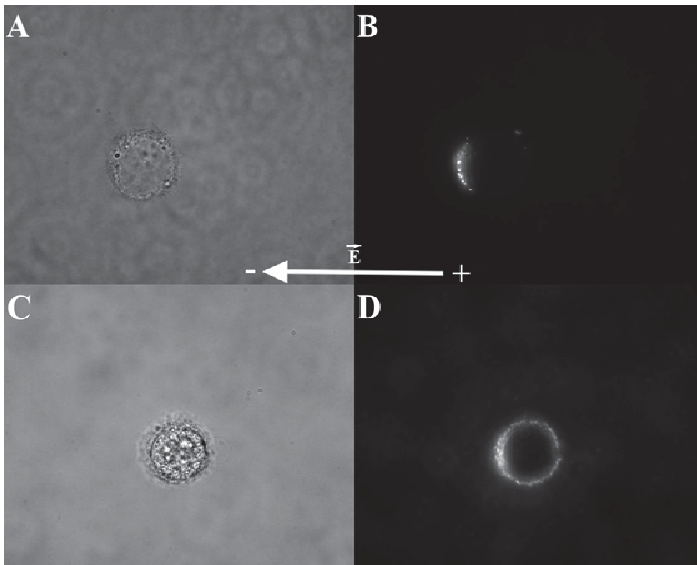


Fig. 1. Representative histograms for GFP fluorescence (left) and scatter plots (right) obtained from the flow cytometer for (A) $[Mg] = 0.5 \text{ mM}$ and (B) $[Mg] = 50 \text{ mM}$. Fraction of cells expressing GFP was calculated as a number of viable fluorescent cells divided by number of all viable cells (see Eqs. (5) and (6)). Histograms for GFP fluorescence (left) shows in region (a) counted viable non-fluorescent cells and in region (b) counted viable fluorescent cells. Scatter plots (right) shows in region (c) counted (viable) cells and in region (d) not counted (death) cells. $4 \times 200 \mu\text{s}$ pulses ($E = 1.4 \text{ kV/cm}$) with repetition frequency 1 Hz were used at room temperature ($T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$).



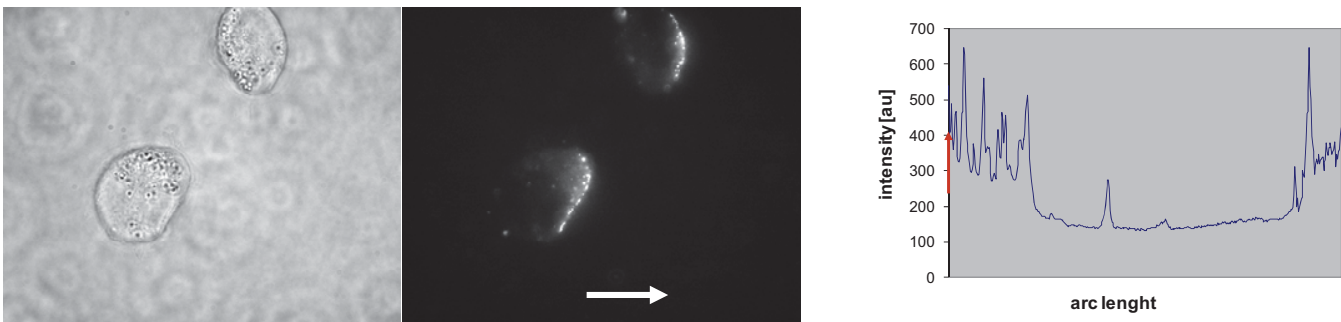
Relation between electropermeabilization for PI and gene electrotransfer at $[Mg] 1 \text{ mM}$ and 50 mM . Uptake of PI - $f(\text{PI}) = \text{Permeabilization}/100$ (see Eq. 2) and fraction of cells expressing green fluorescent protein - $f(\text{GFP})$ (see Eq. 3) as a function of different electric field strength used is presented: (\bullet) $f(\text{PI})$ in $[Mg] = 1 \text{ mM}$; (\circ) $f(\text{PI})$ in $[Mg] = 50 \text{ mM}$; (\blacktriangledown) $f(\text{GFP})$ in $[Mg] = 1 \text{ mM}$; (\triangle) $f(\text{GFP})$ in $[Mg] = 50 \text{ mM}$.

Priloga- zaključno poročilo J2-9770



Fluorescence microscopy observation of DNA-membrane interaction when using different [Mg]. Plated cells were incubated in presence of TOTO-1 labeled DNA (pEGFP-N₁) and different [Mg] in electroporative media (1 mM and 50 mM). 8 x 5 ms ($E = 0.7$ kV/cm) pulses were applied with repetition frequency of 1 Hz to observe DNA-membrane interaction (concentration of labeled DNA in electroporative media was 10 $\mu\text{g/ml}$). (A) phase contrast image of treated cells in [Mg] = 1 mM; (B) fluorescence image of treated cells in [Mg] = 1 mM; (C) phase contrast image of treated cells in [Mg] = 50 mM; (D) fluorescence image of treated cells in [Mg] = 50 mM. The white arrow in the middle indicates the direction of the applied electric field.

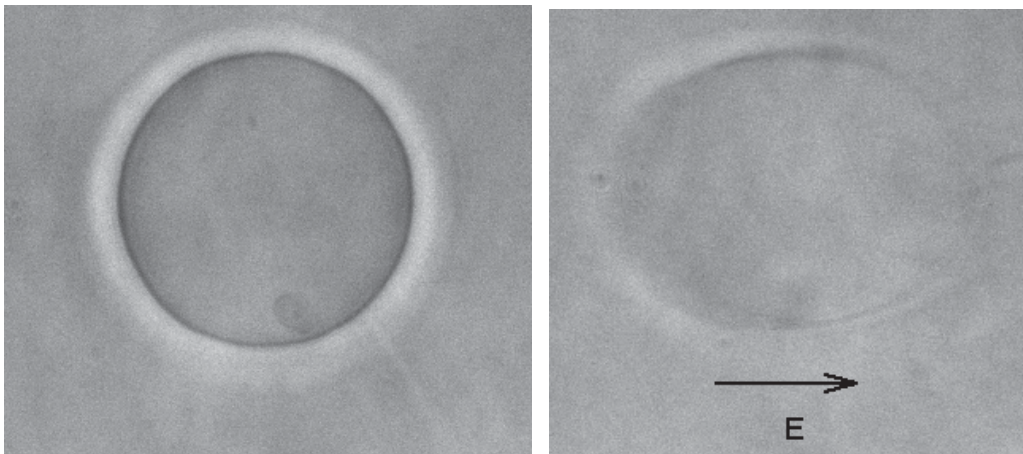
Visualization of the interaction of DNA with the cell membrane



Left – phase contrast image, middle - fluorescence (the arrow shows direction of the electric field, white dots represent TOTO labeled DNA), right - fluorescence intensity on the cell membrane.

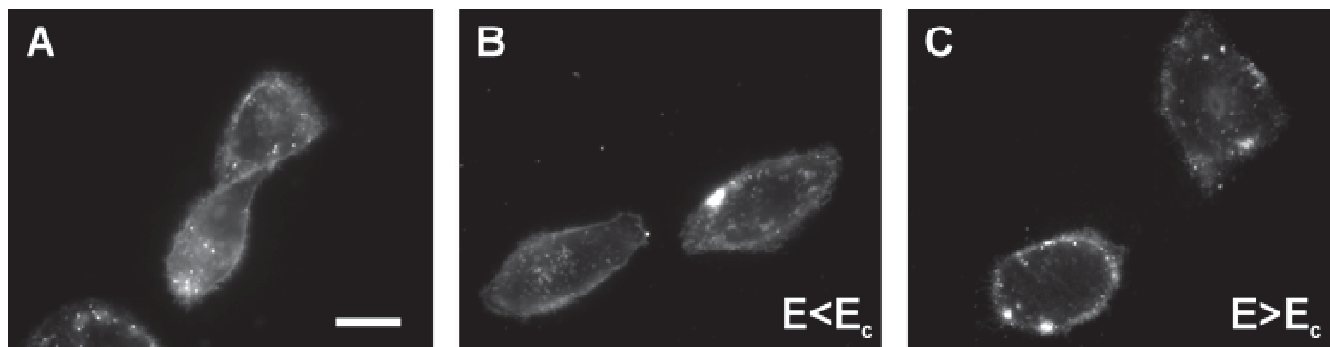
Visualization of pore formation and endocytosis on giant lipid vesicles

Priloga- zaključno poročilo J2-9770



Giant lipid vesicle (left) exposed to $E=2.1$ kV/cm, 1 ms pulse (right).

Analysis of electro-stimulated endocytosis as possible mechanism of transfer into the cell



Long-term observations of endocytosis in cells exposed to electric fields. Cells were stained with FM 1-43FX 20 min after pulse delivery. Fluorescence images were recorded 20 minutes after EP. (A) Cells not exposed to electric field (control). (B) Cells exposed to $E < E_c$. (C) Cells exposed to $E > E_c$. A train of 4×200 μ s pulses, with repetition frequency of 1 Hz was used. The bar in panel A represents 10 μ m.

Development of 3-D collagen gel with embedded CHO cells

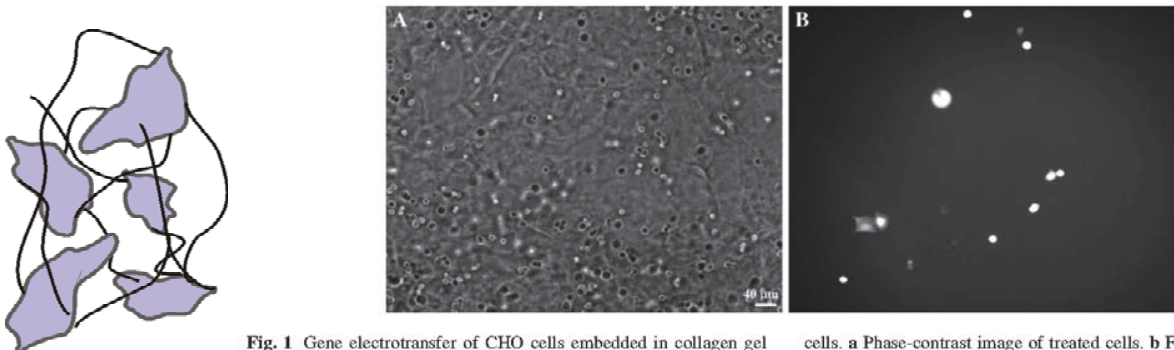
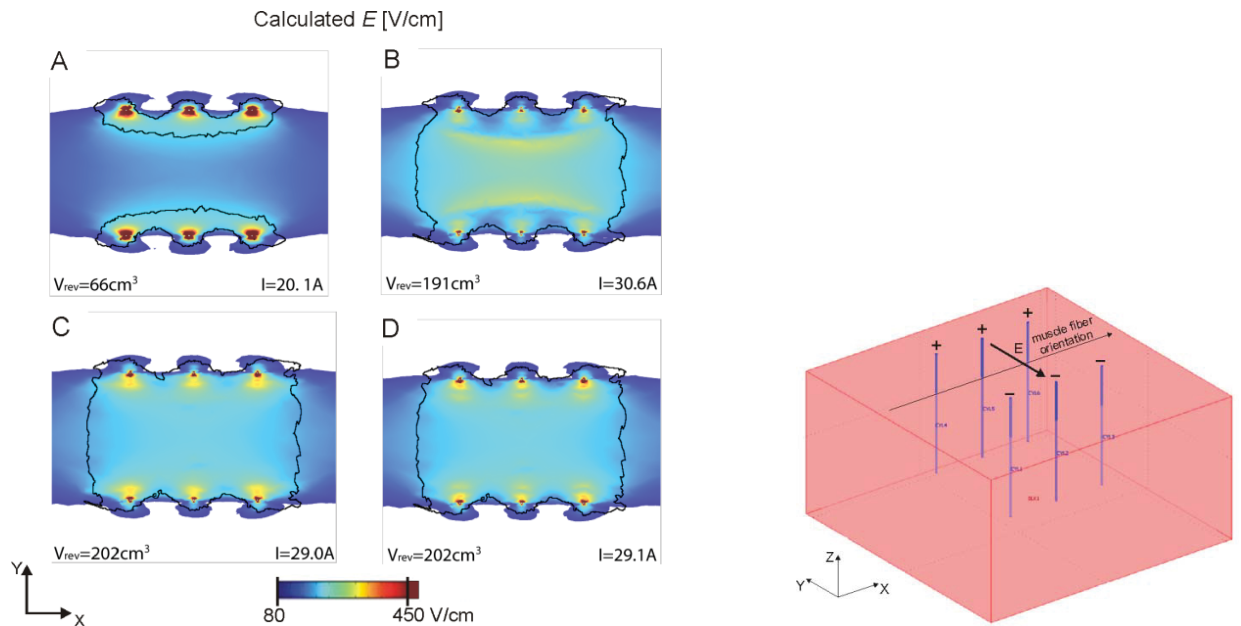


Fig. 1 Gene electrotransfer of CHO cells embedded in collagen gel 24 h after pulse application. Pulses of 8×10 ms ($E = 0.8$ kV/cm) were applied with repetition frequency of 1 Hz to deliver pEGFP (concentration of DNA in electroporative medium 90 μ g/ml) into

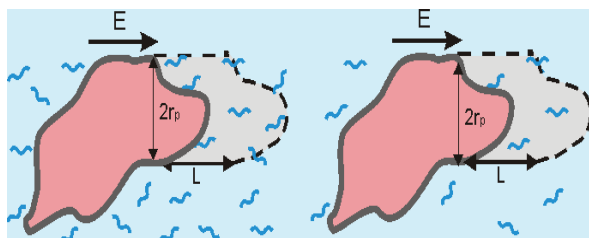
cells. **a** Phase-contrast image of treated cells. **b** Fluorescent image of cells expressing GFP protein (white). To visualize and quantify transfection, $\times 10$ objective magnification was used

3D numerical modelling

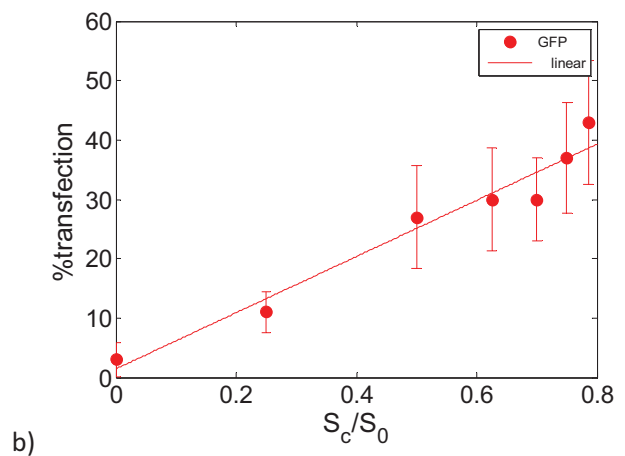
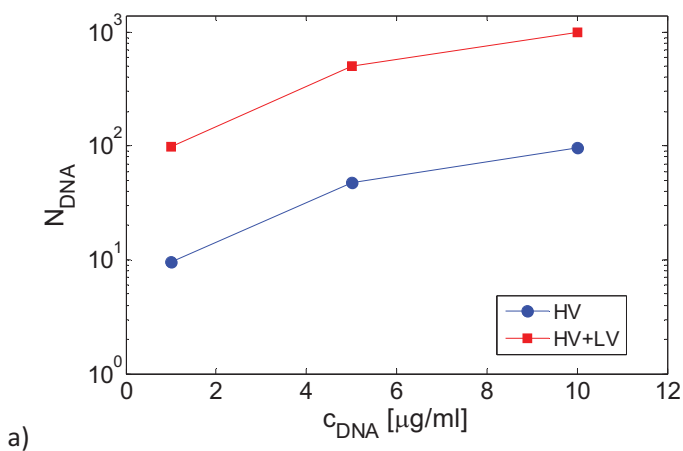


Four steps of the sequential analysis (A-D) of the electroporation process for three needle electrode pairs: the optimum parameters as determined by the genetic algorithm were: $d = 56$ mm, $b = 28$ mm, $z = 40$ mm, $\varphi = 90^\circ$, $U = 1400$ V. The electric field distribution is shown for a plane perpendicular to electrode insertion 2 cm deep in muscle tissue. The black contour represents the muscle area that has been reversibly electroporated, i.e. area where the conductivity values have changed according to Eq. xx.

Theoretical analysis of DNA mobility



Schematic representation of the number of molecules available for contact with the cell membrane, where L is the typical distance traveled during the pulse and r_p is radius of the permeabilized cap. Bright shaded region represents volume V from which DNA molecules are brought in contact with the cell membrane.



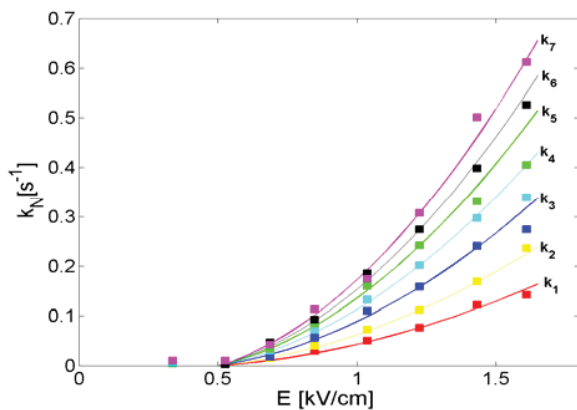
a) Number of DNA molecules available for contact with the permeabilized part of the cell membrane for different plasmid DNA concentrations. b) Percentage of transfected cells depending on the normalized area of the cell membrane exposed to the above threshold electric field, i.e. the permeabilized surface S_c/S_0 .

Theoretical analysis of short – and long-lived pores

We can assume that pore formation in the area where the induced transmembrane voltage $ITV > ITV_c$ is governed by the free energy of the pore, where the electrostatic term includes also the square of the electric field $\Delta W_e = aE^2$. Based on this we can assume that the most simplified equation, which describes the field dependent permeability, can be written as:

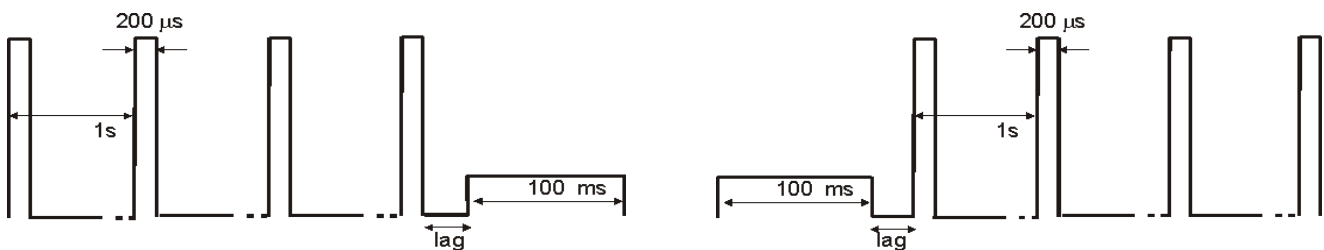
$$k_N(E) = C_N(1 - E_c / E) E^2 ,$$

where C_N are constants that depend on the size of the "transport" pores and their growth, and are thus dependent also on the number of pulses. The above equation takes into account the increase of the area of the cell exposed to the above critical voltage and the quadratic field dependence in the permeabilized region.



The permeability coefficients k_N (symbols) after the N-th pulse obtained from measured ion efflux between the electric using $8 \times 100 \mu s$ pulses and comparison of the prediction of the model calculated using Eq. $k_N(E) = C_N(1 - E_c/E)E^2$ (lines) and the measured permeability coefficients.

Prototip visoko-napetostnega generatorja ki omogoča različne kombinacije HV+LV, LV+HV pulzov



Above: example of possible HV+LV, LV+HV pulsing protocols