

Ulrich Zimmermann und  
Helga Stopper

# Elektrofusion und Elektropermeabilisierung von Zellen

Eine neuartige Methode der Biotechnologie zur gezielten Veränderung der genetischen Eigenschaften von Zellen

Die Biotechnologie ist heute neben der Datenverarbeitung und der Mikroelektronik eine der neuen Schlüsseltechnologien. Von der modernen Biotechnologie wird erwartet, daß sie zentrale Probleme der Menschheit umweltfreundlich lösen kann: etwa die ausreichende Versorgung mit Energien, Rohstoffen, Nahrungsmitteln und Medikamenten sowie die Beseitigung von Schadstoffen in Abwässern. Die technische Möglichkeit, die Eigenschaften von Zellen auf der genetischen Ebene zu verändern, wird auch „genetic engineering“ genannt. Sie erlaubt

- die Entwicklung von mikrobiellen Stämmen mit erhöhten, veränderten oder neuartigen Stoffwechselleistungen,
- die Gewinnung von mikrobiellen oder tierischen Stämmen zur Produktion von Medikamenten, z. B. monoklonalen Antikörpern und
- die Züchtung von neuen Pflanzen, die höhere Erträge liefern oder resistent gegen Krankheitskeime oder Salzwasser sind.

Im Prinzip läßt sich die Erbinformation eines Organismus durch zwei komplementäre Techniken *in vitro* (also gewissermaßen im Reagenzglas) verändern: mit Hilfe der Zellfusion und durch direkten Gen-(Plasmid-)Transfer.

Die bisher verwendeten, konventionellen Fusions- und Gentransfer-Techniken, die überwiegend Chemikalien bzw. inaktivierte Viren verwenden, sind nicht immer sehr effizient und lassen sich nur schwer kontrollieren.

Die Entwicklung von elektrischen Methoden für die *in-vitro*-Zellfusion und für DNS- und Protein-Transfer durch biologische Membranen ist möglicherweise eine interessante Alternative zu den herkömmlichen Verfahren. Sie erlauben nämlich einen optisch kontrollierbaren und durch physikalische Gesetze determinierten Ablauf der Fusion und des

Gentransfers. Ein technischer Einsatz dieser Methoden ist deshalb in den Bereich des Möglichen gerückt.

Die Elektrofusion von Zellen und die elektrisch induzierte Einschleusung von niedermolekularen Substanzen und von Makromolekülen durch Membranen beruhen auf dem reversiblen elektrischen Durchbruch der Zellmembran in einem äußeren elektrischen Feld. Dieser führt zu einer lokalen, reversiblen und kontrollierbaren Elektropermeabilisierung der Zellmembran. Das elektrische Feld darf hierbei nur kurz, größenordnungsmäßig einige Mikrosekunden, anliegen.

Der reversible elektrische Durchbruch war im Jahre 1973 eine Zufallsentdeckung [1, 2] und stand im Widerspruch zur damaligen Lehrmeinung. Diese besagte, daß hohe elektrische Felder Zellen (bzw. Zellmembranen) irreversibel zerstören [3]. Eine Reihe von Wissenschaftlern bestritten deshalb zunächst das Auftreten reversibler elektrischer Feldefekte in biologischen Membranen [3, 4]. Erst später wurde die Möglichkeit konzipiert [5], daß sich die Zellmembran für längere Zeit unter reversiblen Bedingungen permeabilisieren läßt, und daß der intrazelluläre Pool durch Austausch von Makromolekülen (aber auch anderer, niedermolekularer Stoffe) gezielt verändert werden kann. Man hatte erkannt, daß die Zeitdauer der Einwirkung des Feldes auf die Zellen entscheidend ist: Während im Bereich von einigen Mikrosekunden ein reversibler Durchbruch eintritt, wird bei längeren Impulsen die Zelle zerstört. Aus der Entdeckung von 1973 ist heute ein etabliertes und schnell weiterwachsendes Forschungsgebiet geworden.

## Reversibler Durchbruch und Elektropermeabilisierung

Bei Überschreiten der Durchbruchsspannung  $U_c$  des Membrankondensators von ca. 1 V bricht die Membran lokal durch; strukturelle Änderungen in der Membran führen zu einer Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit und

der Permeabilität der Membran. Diese Permeabilitätsänderungen sind reversibel. Die Zellmembran gewinnt nach Abschalten des äußeren Feldes ihren ursprünglichen, hohen elektrischen Widerstand und ihre Impermeabilität zurück. Dies gilt vor allem dann, wenn die Temperatur der Zellsuspension auf 37 °C angehoben wird. Ursache für diese temperaturabhängige Regenerierung der Membranzstruktur und -funktion sind in der Fluidität der Membran und in enzymatischen Prozessen zu suchen.

Der Zusammenhang zwischen der induzierten Membranspannung  $U_c$  und der äußeren Feldstärke  $E_0$  läßt sich durch folgende Überlegungen und Gleichungen verständlich machen. (Die genaue Berechnung erfolgt über die Integration der Laplace-Gleichung [6].) Für die interne elektrische Feldstärke  $E_i$  in einem sphärischen Teilchen mit isotropen Eigenschaften, das sich in einem äußeren Feld  $E_0$  befindet, gilt (siehe auch Abbildung 1)

$$E_i = \frac{3 \cdot E_0 \cdot K_o}{K_i + 2 \cdot K_o} \quad (1)$$

$K_i$  und  $K_o$  sind die komplexen spezifischen Admittanzen im Teilcheninneren bzw. im Außenmedium. Es ist [7]:

$$K = \sigma + j\omega\epsilon\epsilon_r ;$$

$\sigma$  ist die spezifische Leitfähigkeit,  $\epsilon_r$  die elektrische Konstante relativ zum leeren Raum und  $\epsilon = 8,84 \cdot 10^{-12}$  Farad/m.

Aus dem internen elektrischen Feld läßt sich relativ leicht die generierte Membranspannung  $U_c$  einer Zelle bestimmen. Wir nehmen an, daß die Zelle ein sphärischer Körper ist, der durch eine nicht- (oder nur schwach-) leitende Schale mit geringer Dicke von der leitenden Außenlösung abgegrenzt ist (Abbildung 1). Unter dieser Bedingung, die für Zellen bei Gleichstromfeldern oder bei Wechselstromfeldern niedriger Frequenz immer zutrifft, ist  $K_i \approx 0$ . Mit Gleichung 1 gilt dann

$$E_i = 1,5 \cdot E_o \quad (2)$$

Dabei ist  $E_i$  eine über die Zelle gemittelte Feldstärke. Die Spannung über der Zelle ist dann gleich  $2a \cdot E_i$  ( $a$ : Zellradius). Dies gilt für eine homogene, schwachleitende Zelle ebenso wie für eine Zelle, die ein hochleitendes Innenmilieu aufweist, aber von einer schwachleitenden Membran umhüllt ist. Zu dem für uns wichtigen zweiten Fall teilt sich die gesamte Spannung über der Zelle praktisch ausschließlich auf die beiden schwachleitenden Membranen auf. Für eine Position an den Polen der Zellen (d. h. an den Stellen in Feldrichtung) gilt somit für die induzierte Membranspannung

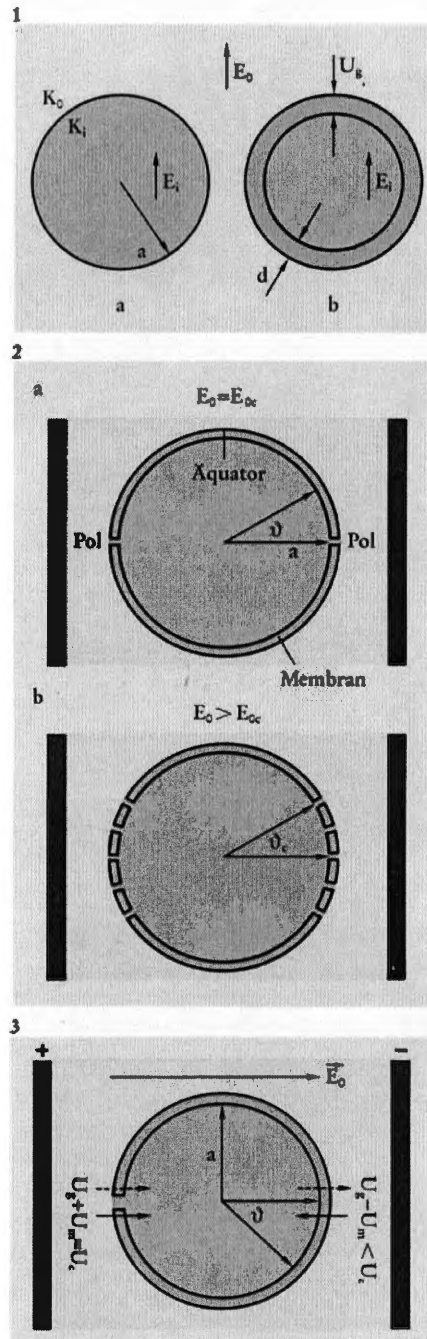
$$U_g = 1,5 E_o a \quad (3)$$

Dabei soll die Membrandicke  $d$  sehr viel kleiner als der Zellradius  $a$  sein. Die exakte Lösung der Laplace-Gleichung [6] ergibt als Membranspannung für Membranorte mit beliebiger Richtung zum Felde (siehe Abb. 2)

$$U_g = 1,5 E_o a \cos\vartheta \quad (4)$$

Voraussetzung für die obigen Beziehungen ist, daß das Feld bis zur Einstellung der Gleichgewichtsspannung anliegt. Bei Feldimpulsen von kurzer Dauer ist dies nicht immer der Fall, insbesondere dann nicht, wenn die Zellen in schwach leitenden Lösungen suspendiert sind.

Die Geschwindigkeit des Spannungsaufbaus über der Membran hängt nicht nur vom Widerstand und der Kapazität der Membran selbst ab, sondern auch von den spezifischen Leitfähigkeiten der innen und außen an die Membran angrenzenden Lösungen. Nach Gleichung 4 können aufgrund der Radiusabhängigkeit der induzierten Spannung größere Zellen leichter, d. h. bei kleineren Feldstärken, zum Durchbruch gebracht werden als kleinere. Außerdem ist aufgrund der Winkelabhängigkeit die durch den externen Feldpuls induzierte Membranspannung in Feldrichtung am größten, während sie für  $\vartheta = 90^\circ$  verschwindet (Abbildung 2). Sukzessive Erhöhung der äußeren Feldstärke  $E_o$  führt deshalb für  $E_o = E_{oc} = U_c / (1,5 a)$  zunächst zu einem elektrischen Durchbruch jener Membranbereiche, die bei  $\vartheta = 0$ , also in Feldrichtung liegen (Pole in Abbildung 2). Erst nach Applikation von Feldpulsen höherer Intensität brechen auch Membranbereiche mit  $\vartheta > 0$  durch. Diese Winkelabhängigkeit des Durchbruchs ist in Abbildung 2 durch



„Poren“ in der Membran angedeutet. Der zugehörige kritische Winkel bestimmt sich aus Gleichung 4. Wie neueste Untersuchungen gezeigt haben [8], muß zu dieser Winkelabhängigkeit der Durchbruchsspannung auch die Asymmetrie des elektrischen Durchbruchs in den beiden Hemisphären der Zelle mit in die Überlegungen einbezogen werden. Durch Diffusions- und elektrogene Prozesse in der Membran bedingt, liegt nämlich eine intrinsische Potentialdifferenz  $U_m$  über der

Abb. 1. Sphärischer Körper a) ohne und b) mit Membranhülle in einem elektrischen Wechselfeld der Feldstärke  $E_o$ ;  $E_i$  ist die induzierte elektrische Feldstärke im Zellinneren;  $K_o$  und  $K_i$  sind die komplexen Admittanzen im Außen- und Innenraum.

Abb. 2. Schematische Darstellung der Permeabilisierung einer Zelle im elektrischen Feld. Die induzierte Membranspannung  $U_g$  und damit die Durchbruchsspannung  $U_c$  ist gemäß Gleichung 4 bei gegebenem Radius  $a$  proportional zur äußeren Feldstärke  $E_o$ . a) Aufgrund der Winkelabhängigkeit erfolgt der elektrische Durchbruch der Membran bei der kritischen äußeren Feldstärke  $E_o = E_{oc} = U_c / (1,5a)$  an den „Polen“ der Zelle, d. h. in Feldrichtung. b) Bei überkritischen Feldstärken  $E_o > E_{oc}$  wird die Durchbruchsspannung auch für Bereiche  $\vartheta > 0$  erreicht. Dies ist durch die Bildung von Poren angedeutet. Am „Äquator“ der Zelle, d. h. rechtwinklig zur Feldrichtung, ist die induzierte Membranspannung immer gleich Null, dort erfolgt auch kein Durchbruch.

Abb. 3. Oft liegt eine intrinsische Ruhepotentialdifferenz  $U_m$  über der Membran an (innen negativ in bezug auf die Außenlösung). Unter den hier vereinfacht dargestellten Bedingungen wird die induzierte Spannung  $U_g$  auf der der Anodenseite zugewandten Membranhälfte zu  $U_m$  addiert, während auf der Kathodenseite eine Subtraktion erfolgt. Durchbruch wird deshalb bei der kritischen Feldstärke  $E_{oc}$  nur auf der Anodenseite bei  $U_g + U_m = U_c$  beobachtet.

Membran vor, der die induzierte Membranspannung  $U_g$  überlagert wird (Abbildung 3).  $U_m$  liegt in der Größenordnung von 0,1 V, wobei das Zellinnere normalerweise negativ gegenüber der Außenlösung ist. Wie Abbildung 3 zeigt, erfolgt die Überlagerung der beiden Membranpotentialdifferenzen in der einen Hemisphäre additiv, in der anderen subtraktiv. Da die Gesamtspannungsdifferenz über der Membran das Durchbruchverhalten der Zelle bestimmt, wird der Durch-

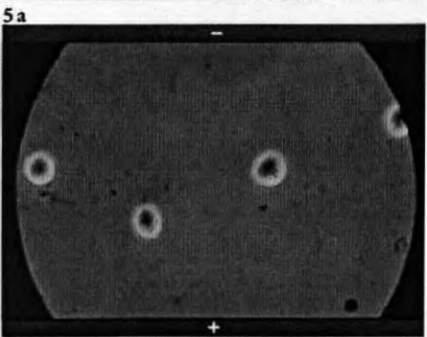
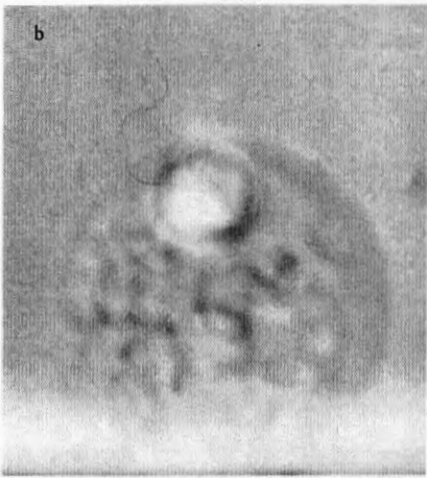
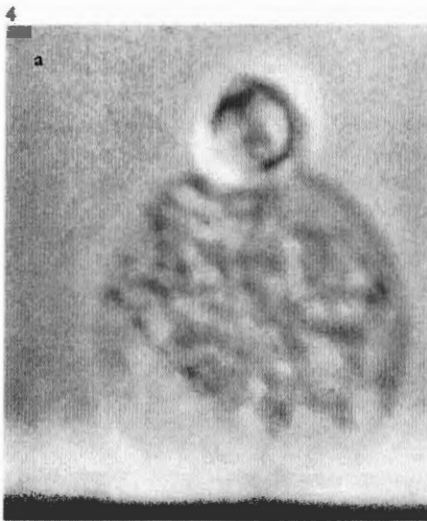


Abb. 4. Feld-induzierte Aufnahme einer intakten Maus-Lymphozytenzelle durch eine Friend-Zelle. a) Die Lymphozyten- und die Friend-Zelle wurden zunächst durch ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld mit 1 MHz Frequenz und 20 kV/m Feldstärke in einen engen Membrankontakt gebracht. Anschließend wurde ein Feldpuls von 20  $\mu$ s Dauer und einer Feldstärke von 350 kV/m appliziert. Bei dieser Feldstärke wird die Durchbruchsspannung der Membran der großen Friendzelle, nicht aber die der kleineren Lymphozytenzelle, erreicht. b) Infolgedessen wird feld-induzierte Aufnahme (Photographie 30 Sekunden nach Feldpuls), nicht aber Fusion, beobachtet. Bei diesen Experimenten waren die Zellen in einer isotonen Mannit-Lösung enthalten.

Abb. 5. Asymmetrische Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid (fluoresziert blau) durch die der Anodenseite zugewandten Hemisphäre einer Maus-Myelom-Zelle. Feldbedingungen: Drei Pulse im Abstand von je 0,5 Sekunden, Feldstärke 1200 kV/m, 20  $\mu$ s Pulslänge. Nach Behandlung mit Pronase wurden die Zellen zum Pulsen in isotope Zuckerlösung mit je 33 mM KCl und NaCl überführt. Die Aufnahme (a) zur Positionskontrolle wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen; die Aufnahme (b) erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop 60 Sekunden nach Applikation des Feldpulses, also nach Aufnahme des Farbstoffes.

bruch zunächst für Membrangebiete in der Hemisphäre der Zelle erfolgen, bei der die beiden Spannungsdifferenzen die gleiche Richtung aufweisen. Erst bei deutlich höheren Feldstärken tritt der Durchbruch auch in der gegenüberliegenden Hemisphäre auf, in der die beiden Spannungen antiparallel gerichtet sind. Da die intrinsische Potentialdifferenz  $U_m$  auch durch die Oberflächenladungen bestimmt wird, sollte die Asymmetrie des Durchbruchs von der Netto-Oberflächenladung auf der Membran abhängen. Diese Vermutung läßt sich in der Tat durch das Experiment bestätigen, wenn diese Oberflächenladung durch Vorbehandlung der Zellen mit Enzymen oder durch Variation des Elektrolytgehaltes in der Außenlösung variiert wird.

### Die Elektropermeabilisierung in der Praxis

Wir wollen nun zwei Beispiele für den reversiblen elektrischen Durchbruch und für die Asymmetrie des Durchbruches in einer Hemisphäre geben. In Abbildung 4 sind eine große und eine kleine Zelle miteinander in Kontakt gebracht worden. Einen Durchbruch erleidet nur die große Zelle, wenn die Feldstärke des externen Pulses so gewählt wird, daß nach Gleichung 4 die Durchbruchsspannung der kleineren Zelle nicht überschritten wird. Unter diesen Bedingungen wird die kleinere Zelle von der größeren Zelle aufgenommen.

Abbildung 5 zeigt die elektrisch induzierte Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoff in Myelom-Zellen von Mäusen. In Lösungen mit geringem Elektrolytgehalt, z. B. isotonen Zuckerlösungen, wie sie bei der konventionellen Elektrofusionsmethode verwendet werden, wird der Farbstoff gemäß Abbildung 3 bevorzugt durch die der Anodenseite zugekehrten Hemisphäre der Zellen aufgenommen; bei höherer Ionenstärke, etwa isotonen Zuckerlösungen, die etwa 45 mM (millimolaren) Elektrolyt, wie NaCl oder KCl, enthalten, wird symmetrische Aufnahme beobachtet.

Bei isotonen Zuckerlösungen, die etwa 70 mM Elektrolyt enthalten, tritt dagegen sehr oft erneut asymmetrische Aufnahme ein, diesmal aber durch die der Kathodenseite zugewandten Hemisphäre.

Für die bei mittlerer Elektrolytkonzentration beobachtete symmetrische Aufnahme ist offensichtlich die natürliche Membranpotentialdifferenz vernachlässigbar klein.

Enzymatische Vorbehandlung der Zellen mit Pronase oder Dispase in nichtleitenden und leitenden Lösungen führt zu einer ausgeprägteren asymmetrischen Aufnahme von der anodischen Hemisphäre her.

Ein weiterer wichtiger Parameter für den Stoff-Transfer ist die Temperatur. Die Elektropermeabilisierung sollte möglichst bei Temperaturen unterhalb von 20 °C erfolgen. Die Dauer der elektrisch induzierten Erhöhung der Membranpermeabilität muß nämlich lang genug sein, um einen effizienten Stoffaustausch zwischen Zelle und Medium zu ermöglichen. Oberhalb der Raumtemperatur laufen die Ausheilprozesse in der Membran so schnell ab, daß kein ausreichender

Stofftransport durch die permeabilisierte Membranfläche zustande kommt.

Es sei bereits hier aus Verständnisgründen erwähnt, daß dieser Ausheilprozeß in den Membranen von benachbarten Zellen bei der Verschmelzung oder Elektrofusion anscheinend behindert ist. Nach Durchbruch in der Kontaktzone sich berührender Zellen bildet sich sofort ein zytoplasmatisches Kontinuum zwischen den beiden Zellen. Daher ist es vorteilhaft, Elektrofusion von Zellen bei Raumtemperatur durchzuführen.

Beim elektrisch induzierten Stoff-(Gen-)Transfer bei tiefen Temperaturen muß berücksichtigt werden, daß die elektrische Durchbruchsspannung  $U_c$  stark temperaturabhängig ist. Bei 4 °C liegt  $U_c$  im Bereich von 2 V, gegenüber etwa 1 V bei Zimmertemperatur. Unterhalb von 4 °C steigt die Durchbruchsspannung extrem an. Wie Messungen an Riesenalgenzellen und an künstlichen, planaren Lipidmembranen gezeigt haben, kommt es dann zu irreversiblen Änderungen in der Membran [9].

Weiterhin muß bei Feldpuls-Experimenten mit Zellen berücksichtigt werden, daß es nach elektrischem Durchbruch der Zellmembran nicht nur zu einer Stoffaufnahme in die Zelle kommt, sondern auch zu einem mehr oder minder ausgeprägten Austausch der intrazellulären Stoffe mit der Außenlösung. Insbesondere kann der Austausch zwischen intrazellulärem Kalium mit extrazellulärem Natrium die Lebensfähigkeit der Zellen empfindlich beeinträchtigen. Dies läßt sich vermeiden, wenn die Lösungen, in denen die Zellen suspendiert werden, ausreichend hohe Kaliumkonzentrationen enthalten.

Bedingt durch diese Austauschprozesse sind die Verweilzeiten bei 4 °C nach der Elektropemeabilisierung auf wenige Minuten zu beschränken, da sonst die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigt wird. Die Regenerierung der Membran ist in wenigen Minuten durch eine Erhöhung der Temperatur etwa auf 37 °C zu erreichen. Bei Berücksichtigung dieser experimentellen Randbedingungen lassen sich zell-fremde Stoffe in hoher Ausbeute in Zellen einbringen, etwa Farbstoffe, Pharmaka, Proteine, Enzyme, Latexpartikel sowie DNS. Wie in Abbildung 4 gezeigt wurde, lassen sich sogar ganze Zellen in Wirtszellen einschleusen.

Die besten Ergebnisse bei der elektrisch indu-

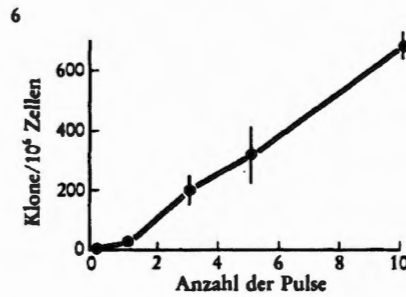
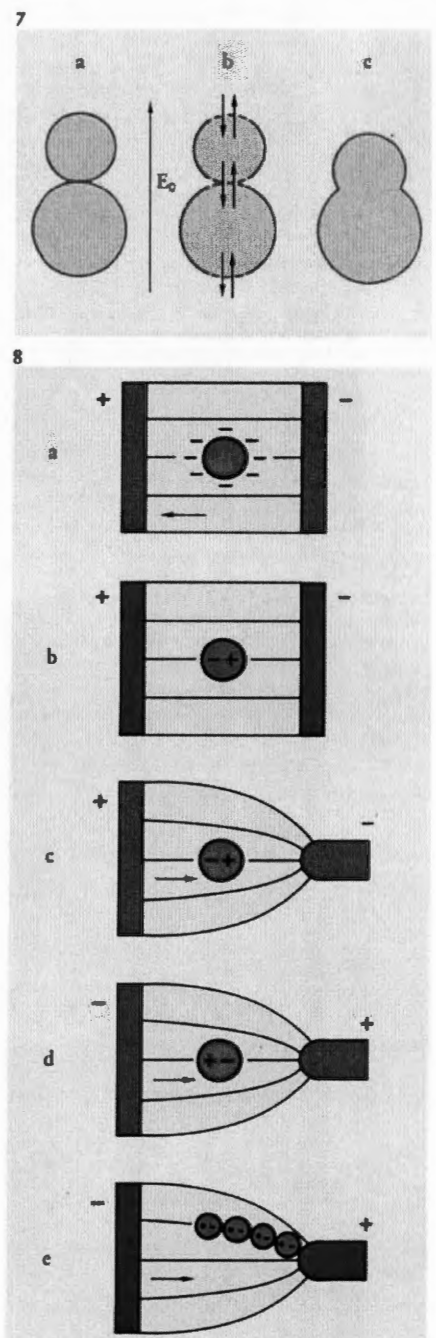


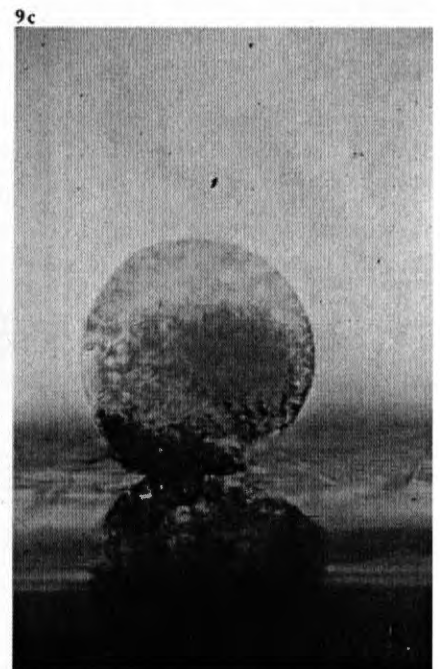
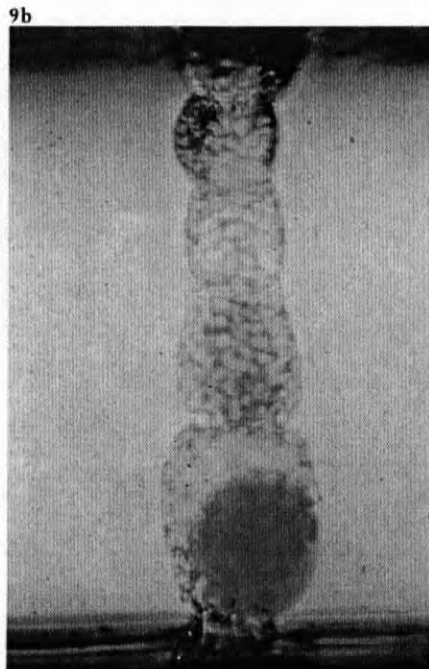
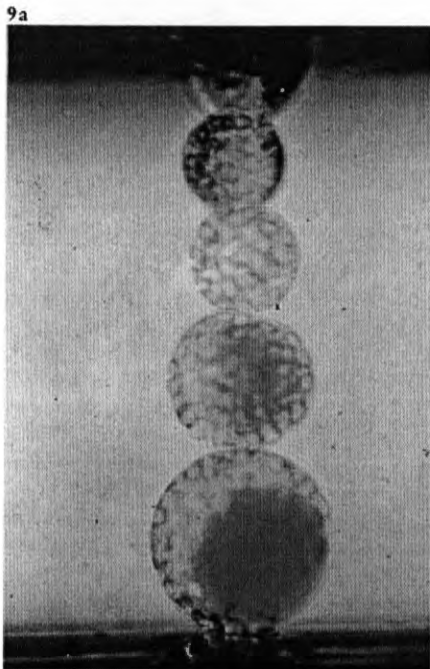
Abb. 6. Abhängigkeit der Zahl an transformierten Klonen von der Zahl der applizierten Pulse bei der elektrisch induzierten DNS-Aufnahme in Maus-L-Zellen. Die Pulse (Feldstärke 1000 kV/m, Pulslänge 5  $\mu$ s) wurden in Abständen von je einer Minute bei 4 °C appliziert.

Abb. 7. Schematische Darstellung der Elektrofusion von zwei Zellen, die in engem Kontakt zueinander in Richtung des elektrischen Feldes (Feldstärke  $E_0$ ) angeordnet sind (a). Der elektrische Durchbruch erfolgt in den Membranbereichen, die parallel zu den Feldlinien (Pfeile) liegen (b). Daraufhin erfolgt Fusion der beiden Zellen (c).

Abb. 8. Schematische Darstellung von Elektrophorese und Dielektrophorese. a) Elektrophorese. Aufgrund ihrer Nettoladung wandern Zellen im homogenen elektrischen Feld (Plattenkondensator) in Richtung einer Elektrode. Die Richtung der Wanderung hängt vom Vorzeichen der Nettoladung der Zelle ab. Im allgemeinen besitzen Zellen eine negative Oberflächenladung. b) Zusätzlich wird in einer Zelle ein Dipol induziert und zwar unabhängig davon, ob eine Nettoladung vorhanden ist. Da die elektrische Feldstärke auf beiden Zellseiten gleich ist, trägt diese induzierte Ladung nicht zur Wanderung der Zelle bei. c) In einem inhomogenen Feld hingegen können auch Partikel/Zellen ohne Nettoladung wandern, da das elektrische Feld auf den induzierten Dipol eine Kraft ausübt. Die Wanderung erfolgt in Bereiche mit höherer Feldstärke. d) Durch Umpolung der Elektroden wird die Wanderungsrichtung (im Gegensatz zur Elektrophorese) nicht verändert. Diesen Effekt bezeichnet man als Dielektrophorese. e) Die in den Zellen induzierten Dipole ziehen sich gegenseitig an. Als Folge bilden sich „Perlenketten“ entlang den Feldlinien aus.

Abb. 9. Elektrofusion von pflanzlichen Protoplasten (in isotoner Sorbitlösung). a) Kettenbildung durch Dielektrophorese (1 MHz Frequenz, 7,5 kV/m Feldstärke), b) Sekunden nach Applikation eines Feldpulses (75 kV/m Feldstärke, 20  $\mu$ s Pulslänge), und c) 10 Minuten nach Feldapplikation. In der fusionierten Zelle vermischen sich die Zellinhalte der verschiedenen Zellen nicht sofort.





zierten DNS-Aufnahme wurden bei 4 °C in isotonen Lösungen erzielt, wobei 30 mM KCl und eine entsprechende Menge an Inositol zugesetzt wurde. Maus-L-Zellen waren mit Dispase vorbehandelt, so daß optimale Durchbruchbedingungen gewährleistet waren. Eingeschleust wurde das Plasmid pSV2-neo, das zu einer Resistenz gegen das Antibiotikum G-418 führt. Vergleichsweise hohe Ausbeuten an transformierten, d. h. Antibiotika-resistenten L-Zellen (in der Größenordnung von 0,1% der behandelten Zellen) konnten unter optimalen Bedingungen erhalten werden. Die Ausbeute bei diesen, aber auch bei anderen Zellsystemen hing von der Feldstärke, der Anzahl der Durchbruchimpulse (Abbildung 6) und dem zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Pulsen ab. Der Befund, daß Mehrfachpulse – bei richtiger Wahl des zeitlichen Abstandes – zu einer wesentlich erhöhten Aufnahme an Genen in die Zelle führt, ist aufgrund der Winkelabhängigkeit der Durchbruchspannung verständlich: In der Zeit zwischen zwei Pulsen verändern die Zellen aufgrund der Brownschen Bewegung ihre Position und Lage zum Feld ein wenig, so daß beim Folgepuls Membranbereiche in Feldrichtung liegen, die beim ersten Puls nicht durchgebrochen waren.

### Herstellung des Zellmembran-Kontaktes für die Zellfusion

Der elektrische Durchbruch von Zellmembranen verursacht die Fusion von Zellen, vor-

ausgesetzt, diese haben einen engen Membrankontakt (Abbildung 7).

Bei der konventionellen Elektrofusionsmethode wird der Zellmembrankontakt über das Phänomen der Dielektrophorese erreicht (Abbildung 8). Dieses Phänomen beruht darauf, daß in einem elektrischen Feld in der Zelle durch Ladungswanderung ein Dipol induziert wird. Ist das Feld inhomogen, wie z. B. zwischen zwei parallelen, zylindrischen Elektroden, wirkt auf den Dipol in der Zelle eine Kraft. Die Zelle wird, wenn sie eine höhere Dielektrizitätskonstante aufweist als das Medium, in die Richtung höherer Feldstärke gezogen. Diese Wanderung von Zellen entlang des Feldgradienten wird auch in einem inhomogenen Wechselfeld beobachtet.

Bei ihrer Wanderung entlang der Feldlinien nähern sich die Zellen einander. Wenn der Abstand nur noch einige Mikrometer beträgt, erfolgt aufgrund der starken Dipolkräfte eine Anziehung (Abbildung 8). Bei einer Feldstärke des Wechselfeldes von etwa 1 kV/m kommen sich die Zellen bis auf einige Nanometer nahe. Elektrischer Durchbruch in der Kontaktzone führt dann zur Fusion der Zellen, da sich ein zytoplasmatisches Kontinuum bildet, das ein „Ineinanderfließen“ der Membranen der benachbarten Zellen ermöglicht. Aus energetischen Gründen rundet sich das entstehende Gebilde ab. Der gesamte Prozeß der Elektrofusion kann unter dem Mikroskop verfolgt werden (Abbildung 9). Die Zahl

der zu fusionierenden Zellen läßt sich über die Suspensionsdichte und durch geeignete Elektrodenkammern steuern.

Eine große Zahl von mikrobiellen, pflanzlichen oder tierischen Zellen lassen sich fusionieren bzw. hohe Ausbeuten an Hybriden können erhalten werden, wenn kommerziell erhältliche Helix- und Rotationskammern verwendet werden (Abbildungen 10 und 11).

In der Regel wird die Fusion der Zellen in schwach leitenden Lösungen (Lösungen geringer Ionenstärke) durchgeführt, um starke Wärmeentwicklung durch das angelegte Wechselfeld zu vermeiden. Derartige Lösungen sind für Zellen nicht schädlich, wenn die Inkubationszeit nicht zu lange ist. Allerdings setzt die Fusion in diesen Lösungen eine genaue Abstimmung zwischen verwendetem Gerät, den eingesetzten Fusions- und Nachbehandlungs-Medien und dem zeitlichen Ablauf des gesamten Fusionsprozesses bis zur Übertragung der Fusionsprodukte in Nähr- oder Selektionsmedien voraus. Diese Problematik ist bei der Anwendung dieser Methode, insbesondere bei der Fusion von tierischen Zellen, sehr häufig übersehen worden. Allerdings liegen heute detaillierte Protokolle für die Elektrofusion von verschiedensten mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Zellen vor, so daß diese physikalische Methode nunmehr auch in den Händen der Biologen und Mediziner erfolgreich eingesetzt wird [8–10].

### Andere Arten der Kontaktbildung

Werden Zellen in hoher Suspensionsdichte einem elektrischen Durchbruchspuls von etwa 20  $\mu$ s Dauer ausgesetzt, so ist der mittlere Abstand zwischen den einzelnen Zellen unter diesen Bedingungen so gering, daß während des Feldpulses Dielektrophorese auftritt. Diese führt zur Ausbildung des notwendigen Membrankontaktes. Selbst wenn das homogene elektrische Feld eines Plattenkondensators verwendet wird, ist doch lokal das Feld durch die hohe Suspensionsdichte so stark inhomogen, daß bei Applikation von Pulsen hoher Feldintensität (die etwa 10 mal höher ist als bei der normalen Dielektrophorese) kurzzeitig erhebliche Wanderungsgeschwindigkeiten und Anziehungskräfte zwischen den Zellen auftreten können.

Auf diesem Weg gelang es bei Entladungsver suchen in Erythrozyten-Suspensionen Elektrofusion zwischen Zellen nachzuweisen [8-10]. Im Prinzip läßt sich Fusion auch in einem dichtgepackten Zellverband, einem Zellpellet, durchführen. Auch dies führt zur Bildung von Hefehybriden und Hybridom-Zellen; allerdings sind zur Zeit noch die Ausbeuten geringer als bei Verwendung der Standard-Elektrofusionsmethode.

Die Ausbeuten sind höher, wenn bei niedriger Suspensionsdichte bzw. bei hoher Verdünnung die Zellen zunächst einer Folge von dielektrischen Durchbruchsimpulsen ausgesetzt werden. Anschließend wird die Zellsuspension zentrifugiert. Die Fusion läuft dann zwischen den dichtgepackten Zellen im Pellet ab. Dieses Verfahren könnte möglicherweise im Gegensatz zum ersteren Verfahren technisch interessant werden, da es einfach ist und hohe Ausbeuten an Hybriden liefert. Allerdings lassen all diese Verfahren keine optische Kontrolle des Fusionsprozesses zu.

Über mechanisch mit Mikropipetten herbeigeführten Kontakt ließen sich zwei pflanzliche Protoplasten fusionieren. Wegen der zu großen Dauer des Feldpulses (Millisekundenbereich) waren die fusionierten Zellen allerdings nicht lebensfähig. Dieses Verfahren ist außerdem nur auf wenige Zellen beschränkt.

Interessanter erscheint das Membranverfahren, bei dem die Elternzellen auf die Oberfläche zweier Membranen (oder Filter) adsorbiert werden. Dies kann elektrostatisch, che-

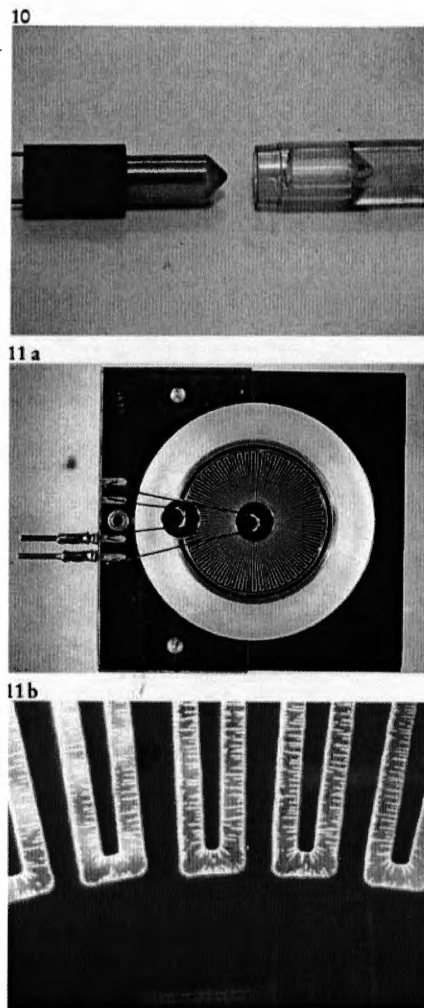


Abb. 10. Helix-Fusionskammer: Die Kammer besteht aus zwei Teilen, einem äußeren Mantelgefäß (rechts), in das die Zellsuspension pipettiert wird, und einem inneren zylindrischen Tubus (links). Um den Tubus sind zwei Platindrähte, die als Elektroden dienen, parallel zueinander aufgewickelt (Länge etwa 1 m). Auf diese Weise entsteht ein großer Elektrodenraum, in dem sehr viele Zellen fusioniert werden können. Beim Experiment wird der Tubus vorsichtig in das Außenmantelgefäß eingeführt. Die Zellen und die Lösung steigen im Zwischenraum zwischen innerer und äußerer Tubuswand hoch. Anschließend wird die Elektrofusion nach den Standardbedingungen durchgeführt. Nachdem sich die fusionierten Zellen abgerundet haben, werden sie entweder durch Herausziehen des Tubus abpipettiert oder durch Öffnen eines Ventils am Boden in ein Gefäß zentrifugiert, das Nährmedium enthält.

Abb. 11. Rotationskammer: Auf einer durchsichtigen Scheibe sind radial parallele Elektroden aufgedampft, so daß ein großer Elektrodenraum entsteht. Zellen werden durch eine Einlaßöffnung auf die Elektrodenoberfläche aufgebracht und anschließend über Zentrifugation durch eine seitliche, ringförmige Nut aus dem Elektrodenraum entfernt. a) zeigt die gesamte Kammer, b) einen vergrößerten Ausschnitt.

misch oder durch Ansaugen in die Filterporen geschehen, die einen etwas kleineren Durchmesser als die Zellen aufweisen. Die beiden Membranen (oder Filter) werden in einem Plattenkondensator mechanisch auf eine so kurze Distanz gebracht, daß die Zellen sich entweder gleich berühren oder durch Dielektrophorese in Kontakt gebracht werden. Applikation von Durchbruchsimpulsen führt zur Fusion der Zellen mit hohen Ausbeuten an Hybriden von Hefezellen und Hybridom-Zellen.

Ein technisch ebenfalls interessantes Verfahren stellt die Magneto-Elektrofusion dar. Die äußere Oberfläche von Zellen wird durch Adsorption kleiner magnetischer Teilchen magnetisiert. Mit Hilfe von gekreuzten magnetischen Feldern werden die Zellen in einem kleinen Volumen konzentriert, das sich zwischen zwei parallelen Elektroden befindet. Die magnetische Kraft, die in das Zentrum zwischen den Elektroden gerichtet ist,

reicht für einen Membrankontakt aus. Das Verfahren erlaubt Elektrofusion von Erythrozyten und Hefezellen in hoher Ausbeute. Dabei kann in leitenden Lösungen fusioniert werden. Vor allem können die entstehenden Produkte relativ einfach über Magnete abgetrennt werden. Während der magnetisch-elektrischen Fusion werden nämlich magnetische Teilchen in das Zellinnere der Fusionsprodukte miteingeschlossen. Da sich die auf den äußeren Oberflächen adsorbierten magnetischen Teilchen über Waschvorgänge entfernen lassen, können die magnetischen Fusionsprodukte anschließend von den nichtmagnetischen Mutterzellen abgetrennt werden.

Vom technischen Standpunkt aus ebenfalls interessant dürfte das vor kurzem entwickelte elektro-akustische Verfahren sein. In einem Schallfeld treten ähnlich geartete Kräfte wie bei der Dielektrophorese auf. Dabei sind aber nicht die elektrischen Eigenschaften der Zelle

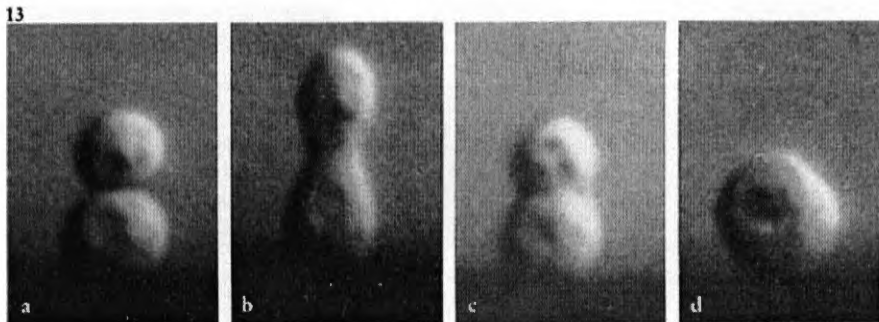
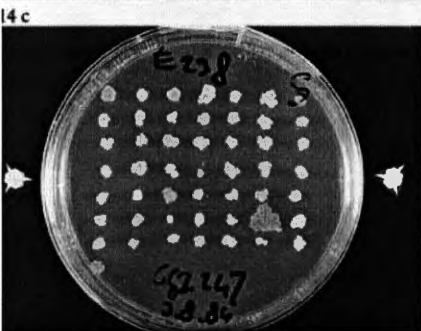
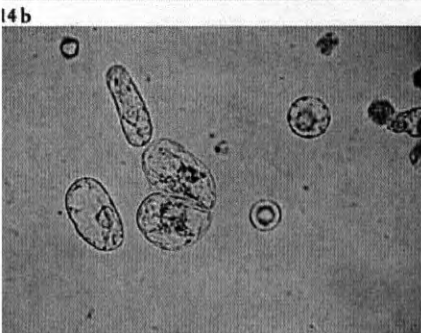
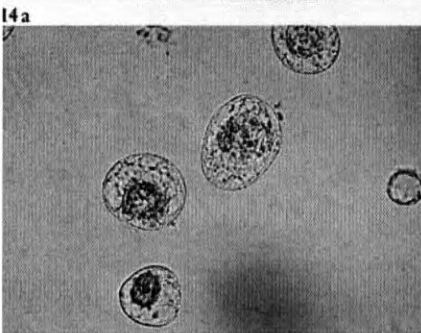
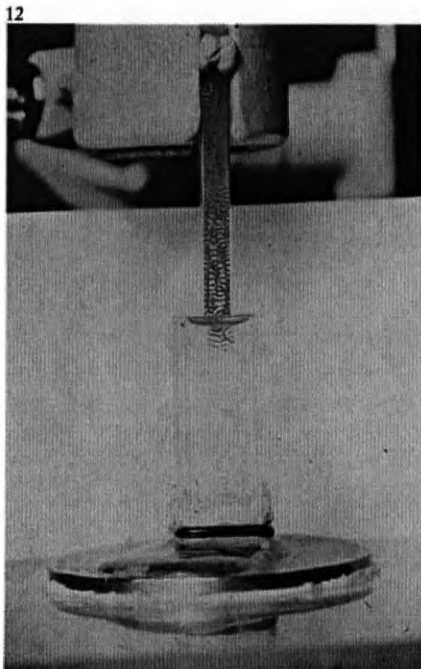


Abb. 12. Konzentration von menschlichen Erythrozyten im stehenden Ultraschallfeld. Rechtwinklig zur Schallausbreitung auf Ebenen, die durch eine halbe Wellenlänge voneinander getrennt sind, erfolgt die Konzentrierung der Erythrozyten zu Banden.

Abb. 13. Elektrofusion von Hefe-Proto-plasten zweier verschiedener Stämme (*Saccharomyces cerevisiae* 2114 und 3441). a) Dielektrophorese wurde in einem elektrischen Wechselfeld durchgeführt (180 kV/m Feldstärke, 2 MHz Frequenz). b) Fusion wurde durch zwei aufeinanderfolgende Durchbruchpulse induziert (700 kV/m Feldstärke, 40  $\mu$ s Pulslänge, Abstand der Pulse: 10 Sekunden). c) Zellen kurz nach dem Durchbruch. d) Nach etwa drei Minuten hat sich das Fusionsprodukt vollständig abgerundet.

Abb. 14. Pflanzenprotoplasten (Kartoffel, Mesophyll und Tabak, Suspension) wurden elektrisch fusioniert (Pulslänge 50  $\mu$ s, Feldstärke 120 kV/m). a) zeigt Fusionsprodukte nach Isolierung mit einer Mikropipette und Kultivierung in Nährmedium. b) Zellteilung. c) zeigt die etwa 6 Wochen später daraus entstandenen Kolonien (Kalli). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. G. K. Jones und Dr. M. J. Tempelaar, Dept. of Biochem., Rothamsted Exp. Station, Harpenden, Herts U. K.

und der Lösung wichtig, sondern die Dichteunterschiede.

In einem Ultraschallfeld lassen sich auf diese Weise Perlenketten von Zellen bilden. Verwendet man stehende Wellen, bilden sich Druckmaxima aus, in denen sich die Zellen konzentrieren und in engen Membrankontakt kommen (Abbildung 12). Bei der Verwendung eines Ultraschallfeldes von 1 MHz Frequenz konnten auf diese Weise Erythrozy-

ten und Myelom-Zellen fusioniert werden. Bei geringen Suspensionsdichten bildeten sich bevorzugt Fusionsprodukte aus zwei Zellen. Das Verfahren erlaubt das Arbeiten in leitenden Lösungen und läßt sich optisch verfolgen.

Auch Chemikalien, wie Polyäthylenglykol, lassen sich zur Herstellung eines Membrankontaktes verwenden. Die Fusion erfolgt dann ebenfalls mit einem Feldpuls. Dieses Verfahren dürfte gegenüber den chemischen Fusionsverfahren, die ebenfalls meistens Polyäthylenglykol verwenden, keine großen Vorteile aufweisen, da der Fusionsprozeß nicht kontrolliert werden kann. Interessanter ist die Verwendung einer spezifischen Avidin-Biotin-Bindung zwischen Lymphozyten und Myelom-Zellen, die nach Applikation des Durchbruchpulses Hybridom-Zellen entstehen läßt.

### Elektrofusion

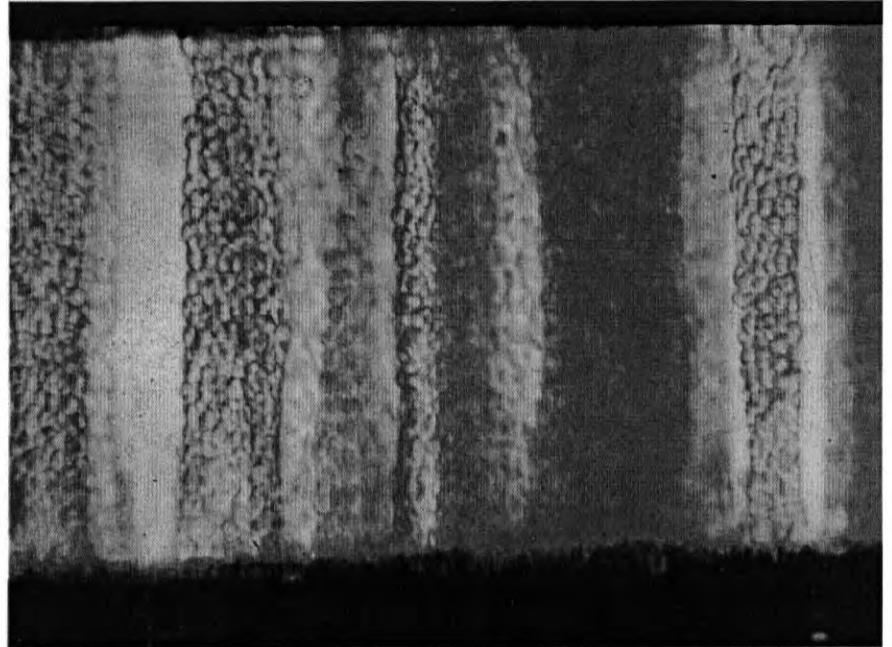
Inzwischen liegen so viele Untersuchungen über Elektrofusion von Zellen vor [8-10], daß diese Methode mit Recht als universell für die Fusion von Zellen und künstlichen Lipid-Systemen angesehen wird. So lassen sich zwei planare Lipidmembranen sowie Zellen mit Liposomen elektrisch verschmelzen.

Die Elektrofusion von Bakterien ist vor kurzem gelungen [8]. Dabei entstanden Hybride, welche die Eigenschaften beider Eltern enthielten. Hefezellen (Abbildung 13) lassen sich besonders gut mit dem elektrischen Verfahren unter hoher Ausbeute fusionieren.

Viele Arbeiten liegen heute über die Fusion von pflanzlichen Protoplasten vor (Abbildung 9). Verschiedene Autoren konnten inzwischen auch zeigen, daß die elektrisch gebildeten Hybride sich teilen und zum Kallus-Stadium (Abbildung 14) bzw. bis zur ganzen Pflanze regeneriert werden können.

Abb. 15. Elektrofusion von menschlichen Erythrocyten: a) Zell-Kettenbildung zwischen zwei parallelen, zylindrischen Elektroden (Abstand 200  $\mu\text{m}$ , 1 MHz Frequenz, 40 kV/m Feldstärke). b) Nach Feldapplikation (600 kV/m Feldstärke, 3  $\mu\text{s}$  Pulslänge) entstehen Riesenzellen.

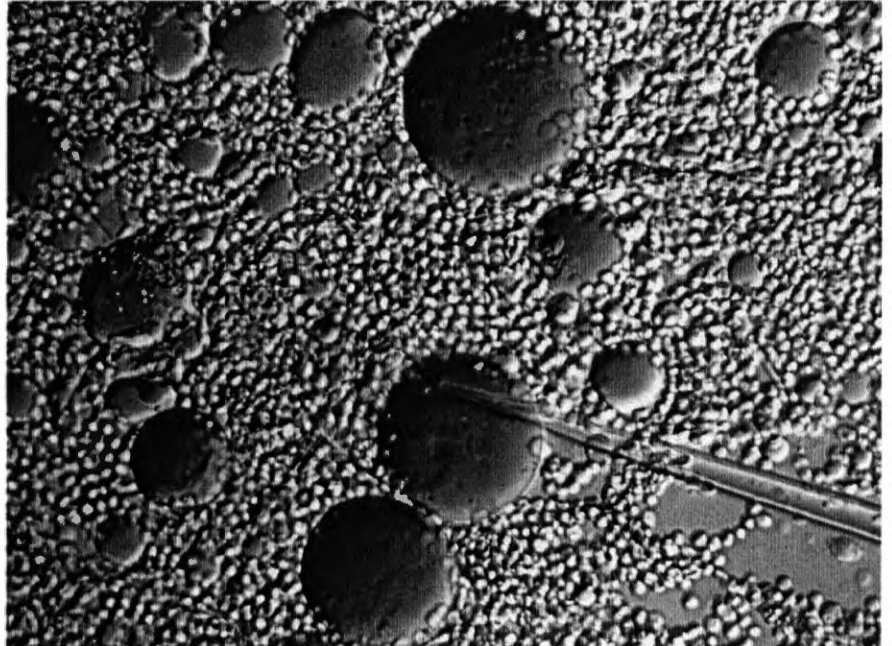
15 a



Auch tierische Zellen können heute mit hoher Effizienz miteinander fusioniert werden, wobei lebensfähige Hybride in hoher Ausbeute erhalten wurden.

Besonders leistungsfähig hat sich die Elektrofusion bei der Produktion von Hybridomzellen erwiesen, die monoklonale Antikörper sezernieren. Monoklonale Antikörper spielen bereits heute aufgrund ihrer hohen Spezifität eine große Rolle in der klinischen Diagnostik, bei der Gewinnung von Naturstoffen und in der Grundlagenforschung. Hybridomzellen werden durch Fusion von Lymphozyten mit Myelomzellen gewonnen. Die Lymphozyten produzieren Antikörper, können aber nicht permanent in Kultur gehalten werden. Myelomzellen sind Tumorzellen. Sie können keine Antikörper mehr produzieren, können aber in Kulturen permanent vermehrt werden. Die Hybridomzelle besitzt beide Eigenschaften ihrer Mutterzellen. Jede Hybridomzelle sondert einen ganz bestimmten (monoklonalen) Antikörper ab; dieser entspricht dem Antikörper, den der Lymphozyten-Fusionspartner abgibt. Klonierung (d. h. Vermehrung) einer Hybridomzelle, die den gewünschten Antikörper absondert, führt dann zu einer Zellpopulation, die große Mengen an spezifischem Antikörper ausschleudert. Im Falle der Elektrofusion von Lymphozyten mit Myelom-Zellen ist es wichtig, daß die Zellen nach der Elektrofusion zunächst in ein Nachbehandlungsmedium gebracht werden, das erhöhte Kalium-Konzentration enthält. Auch der Nachweis, daß diese Hybridom-Zellen monoklonale Antikörper produzieren, liegt inzwischen vor.

15 b



Eizellen können ebenfalls miteinander fusioniert werden, wobei anschließende Befruchtung, Teilung und Differenzierung beobachtet wurde.

Vor kurzem konnte die Ausbeute an Zellhybriden aufgrund einer neuen Entwicklung noch einmal beträchtlich gesteigert werden. Voraussetzung für das Entstehen von Hybri-

16

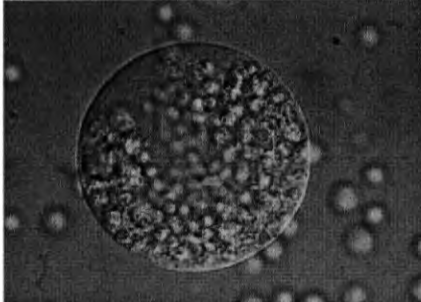


Abb. 16. Bildung einer Riesenzelle bei der Elektrofusion von Friend-Zellen 10 Minuten nach der Applikation eines Feldpulses (Wechselfeld: 10 kV/m Feldstärke, 2 MHz Frequenz, Feldpuls: 200 kV/m Feldstärke, 20  $\mu\text{s}$  Pulslänge).



den ist nicht nur, daß die Zellmembranen benachbarter Zellen miteinander verschmelzen, so daß eine neue Zelleinheit entsteht, sondern daß auch anschließend die beiden Kerne im Fusionsprodukt miteinander verschmelzen. Nur unter dieser Bedingung kann das genetische Material der beiden Kerne neu miteinander kombiniert werden. Die Verschmelzung der Kerne erfolgt in der Regel im Fusionsprodukt, wenn sich die Kerne durch Diffusion zufällig berühren. Kerne lassen sich aber gezielt in einen engen Membrankontakt bringen, wenn bei der Zellkettenbildung Wechselfelder von einigen MHz appliziert werden. Unter diesen Bedingungen wird die Membran der Zelle hinreichend leitfähig, so daß sich im Zellinneren ein elektrisches Feld aufbauen kann. Bei inhomogenen Feldern ausreichender Intensität tritt dann eine dielektrophoretische Wanderung der Kerne in die Kontaktzone der beiden Zellen auf. Nach dem elektrischen Durchbruch der Zellmembranen in der Kontaktzone der Zelle können deshalb die Kerne aufgrund ihrer benachbarten Lage sofort miteinander fusionieren. Dementsprechend hoch ist die Ausbeute an Zellhybriden, die die Eigenschaften beider Fusionspartner haben.

Abschließend soll auch erwähnt werden, daß es mit Hilfe des Elektrofusionsverfahrens möglich ist, tausende von Zellen miteinander zu verschmelzen, so daß Riesenzellen gebildet werden (Abbildungen 15 und 16). Diese Riesenzellen sind interessante Untersuchungsobjekte für die Membranforschung geworden, da Mikroelektroden in sie eingeführt werden können.

Der kontrollierte Ablauf der Elektrofusion erlaubt darüber hinaus – etwa in Kombination mit der Elektronen- und der Fluoreszenzmikroskopie – Membranprozesse und Membraneigenschaften zu studieren. Da die Fusion synchron abläuft, können ebenfalls einzelne Schritte während des Verschmelzungsvorganges mikroskopisch verfolgt werden. Derartige Untersuchungen haben u. a. gezeigt, daß das überschüssige Membranmaterial über die Bildung von Vesikeln in der Kontaktzone entfernt wird.

### Ausblick

Der jetzige Stand der Technik zeigt, daß das Elektrofusionsverfahren mit seinen vielfältigen Alternativen sowie das Elektroporabilitäts-Verfahren nicht nur konkurrenzfähig im Vergleich zu den bisherigen chemischen

Verfahren sind, sondern daß sie neue Perspektiven für die Biotechnologie eröffnen. Die Tatsache, daß innerhalb von nur zwei Jahren über hundert Forschungs- und Industrielaboratorien diese neuen Techniken aufgegriffen haben, unterstreicht diese Aussage. Interessant ist es allerdings – insbesondere vom Standpunkt der Forschungsförderung – festzustellen, daß die theoretischen Erkenntnisse und die grundlegenden Experimente teilweise 10 und mehr Jahre alt sind und erst heute zunehmend an Bedeutung gewinnen. Ein Grund hierfür ist sicherlich darin zu suchen, daß der Eingang von physikalischen Techniken in die Biologie, Biotechnologie und in die medizinische Technik, die vor allem in der Bundesrepublik Deutschland stark biochemisch ausgerichtet sind, immer noch auf erhebliche Schwierigkeiten stößt. Wünschenswert wäre es, wenn auf diesem interdisziplinären Gebiet in Zukunft Physiker mit Biologen und Biotechnologen intensiver kooperieren würden.

Diese Arbeiten wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 165 und 176), des BMFT und der DFVLR gefördert.

### Literatur

- [1] U. Zimmermann, J. Schulz und G. Pilwat, *Biophys. J.* 13, 1005 (1973).
- [2] U. Zimmermann, G. Pilwat und F. Riemann, *Z. Naturforsch.* 29c, 304 (1974).
- [3] E. Neumann und K. Rosenheck, *J. Membrane Biol.* 10, 279 (1972).
- [4] T. Y. Tsong und E. Kingsley, *J. Biol. Chem.* 250, 786 (1975).
- [5] E. Neumann und K. Rosenheck, *J. Membrane Biol.* 32, 231 (1977).
- [6] E. Jeltsch und U. Zimmermann, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6, 349 (1979).
- [7] H. P. Schwan, in: *Biological Effects and Dosimetry of Nonionizing Radiation* (M. Grandolfo, S. M. Michaelson and A. Rindi, eds.), p. 213, Plenum Publishing Corporation (1983).
- [8] U. Zimmermann, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 105, 175 (1986).
- [9] U. Zimmermann, *Biochim. et Biophys. Acta* 694, 227 (1982).
- [10] U. Zimmermann, J. Vienken, J. Halfmann and C. C. Emeis, in: *Advances in Biotechnological Processes* (A. Mizraki und A. Z. van Wezel, Hrsg.), Vol. 4, p. 79, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Ulrich Zimmermann, geb. am 9. März 1942; Abitur 1961 am Ratsgymnasium in Hannover; Chemie- (und Physik-)Studium an der TH in Hannover und an der FU Berlin. 1966 Diplom in Chemie an der FU Berlin und Dr. rer. nat. an der TU Berlin; 1968 Leitung einer Arbeitsgruppe für Membranforschung am Institut für Biophysikalische Chemie der Kernforschungsanlage Jülich; dort 1972 Abteilungsleiter; im gleichen Jahr Habilitation an der FU Berlin; 1974 Habilitation an der TH Aachen; 1975 Ernennung zum außerplanmäßigen Professor; 1976 Honorarprofessor an der TH Darmstadt; Gastprofessur an der New South Wales University Sydney, Australien; nach mehreren Forschungsaufenthalten in den USA, Israel und England, 1984 Ruf an die Universität Würzburg als Inhaber des Lehrstuhles für Biotechnologie.

Helga Stopper, geboren 18. 1. 1960 in Karlsruhe; Studium der Biologie in Regensburg von 1978 bis 1984, 1981/1982 als Austauschstudentin an der University of Colorado in Boulder, USA; Promotion bei Prof. Dr. U. Zimmermann am Lehrstuhl für Biotechnologie in Würzburg 1987.

Anschrift:

Prof. Dr. U. Zimmermann und Dr. H. Stopper, Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität, Röntgenring 11, D-8700 Würzburg.