

Elektrofusion und Elektropermeabilisierung von Zellen

Prof. Dr. U. Zimmermann und H. Stopper
Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg

Einleitung

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 – wie die ausreichende Versorgung mit Energien, Rohstoffen, Nahrungsmitteln und Medikamenten, sowie die Beseitigung von Schadstoffbelastungen in Abwässern – umweltfreundlich lösen kann (1).

Die technische Möglichkeit, die Eigenschaften von Zellen auf der genetischen Ebene zu verändern (genetic engineering), hat (bzw. kann) zur Entwicklung von mikrobiellen Stämmen mit erhöhten, veränderten oder neuartigen Stoffwechselleistungen, zur Gewinnung von mikrobiellen oder tierischen Stämmen zur Produktion von Medikamenten (z.B. monoklonalen Antikörpern) und zur Züchtung von neuen Pflanzen, die höhere Erträge liefern oder resistent gegen Krankheitskeime oder Salzwasser sind, führen.

Im Prinzip läßt sich die Erbinformation eines Organismus durch zwei komplementäre Techniken *in vitro* verändern: durch somatische Hybridisierung 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 beruhen zum Teil nur auf empirischer Basis.

Die Entwicklung von elektrischen Methoden für die *in-vitro*-Zellfusion und für DNA- (und Protein-) Transfer durch biologische Membranen könnte möglicherweise eine interessante Alternative zu den herkömmlichen Verfahren darstellen, da diese Methoden einen optisch kontrollierbaren und durch physikalische Gesetze determinierten Ablauf der Fusion und des Gentransfers erlauben. Ein großtechnischer Einsatz dieser Methoden ist deshalb in den Bereich des Möglichen gerückt (2).

Die Elektrofusion von Zellen und die elektrisch induzierte Einschleusung von niedermolekularen Substanzen und von Makromolekülen durch Membranen beruhen auf dem sog. reversiblen elektrischen Durchbruch der Zellmembran, der zu einer reversiblen, kontrollierbaren Elektropermeabilisierung der Zellmembran führt.

Der reversible elektrische Durchbruch war im Jahre 1973 (3) eine Zufallsentdeckung und stand im Widerspruch zur damaligen Lehrmeinung, die besagte, daß hohe elektrische Felder Zellen irreversibel zerstören [siehe den Übersichtsartikel von Zimmermann (2)]. Eine Reihe von Wissenschaftlern (4, 5) bestritten deshalb zunächst das Auftreten

derartiger elektrischer Feldeffekte in biologischen Membranen und stellten erst später fest (6, 7), daß es möglich ist, unter reversiblen Bedingungen die Zellmembran für längere Zeiten zu permeabilisieren, um so den intrazellulären Pool der Zellen durch Austausch mit Makromolekülen zu manipulieren.

Ein historischer Überblick über die Entwicklung dieser Methoden findet sich bei Zimmermann (2).

Eine Reihe von Übersichtsartikeln über dieses Gebiet sind bisher erschienen (2, 8-17), so daß sich die Autoren dieses Beitrags auf die grundlegenden Aspekte dieser Methoden beschränken wollen, um intensiver auf neueste Entwicklungen eingehen zu können.

Elektrische Permeabilisierung von Zellmembranen

Die Zellmembran stellt – vom elektrischen Standpunkt aus – einen Kondensator dar. Wenn also Zellen einem elektrischen Feld (oder einem elektrischen Feldpuls) ausgesetzt werden, läßt sich der Zellmembran-Kondensator über elektrische Ladungstrennung auf. Die induzierte Spannung ist bei gegebenem Zellradius proportional zur äußeren elektrischen Feldstärke (Abb. 1), vorausgesetzt, daß das Feld so lange anliegt, bis sich das Gleichgewichtspotential einstellen kann (2, 16). Bei Feldpulsen von kurzer Dauer ist dies allerdings nicht immer der Fall, insbesondere dann nicht, wenn die Zellen in schwach leitenden Lösungen suspendiert sind, da die Relaxationszeit des Spannungsaufbaus über der Membran nicht nur vom Widerstand und der Kapazität abhängt, sondern auch von der inneren und äußeren Leitfähigkeit der an die Membran angrenzenden Lösungen (2, 16). Das induzierte Membranpotential wird dem normalen Ruhepotential überlagert, das über der Zellmembran anliegt. Das Ruhepotential entsteht durch Überlagerungen aus Ionen-Diffusionspotentialen, aus Potentialen, die durch elektrogene Pumpen in der Membran entstehen und durch die Oberflächenpotentiale, die aus der negativen Netto-Oberflächenladung der Membran resultieren.

Das Gesamtpotential (bzw. Feld) über der Membran bestimmt das Durchbruchverhalten der Zelle (Abb. 2). Bei einer äußeren Feldstärke von einigen kV/cm (abhängig vom Zellradius, siehe Abb. 1) wird in der Regel die Durchbruchspannung des Membrankondensators, die in der Größenordnung von 1 V liegt, erreicht. Die Membran bricht lokal durch; strukturelle Änderungen in der Membran führen zu einer Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit und der Permeabilität der Membran. Diese Permeabilitätsänderungen sind reversibel, d.h. daß die strukturellen Änderungen in der Membran – wie bei selbstheilenden Kondensatoren – wieder rückgängig gemacht werden können; die Zellmembran gewinnt ihren ursprünglichen hohen elektrischen Widerstand und ihre Impermeabilität zurück. Deshalb wurde dieses Phänomen von Zimmermann et al (3, 18) als reversibler elektrischer Durchbruch bezeichnet, im Unterschied zu den bis zu diesem Zeitpunkt bekannten irreversiblen Zerstörungen von Zellen durch elektrische Felder. Wenn das Gewicht bei der Betrachtung dieser reversiblen elektrischen Feldeffekte mehr auf den sekundär induzierten Prozeß, d.h. auf die Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran, gelegt wird, so wäre der Begriff "Elektropermeabilisierung" die korrektere Beschreibung. Beide Begriffe lassen die beim elektrischen Durchbruch ablaufenden molekularen Mechanismen offen. Der Begriff "Elektroporation",

Vortrag anlässlich des CONCEPT-Symposiums
"Biotechnologie III – Gentechnologie",
6. und 7. Februar 1985, Heidelberg

der kürzlich von Neuman et al. (19) für die Beschreibung des gleichen Effektes eingeführt wurde, impliziert dagegen die Vermutung, daß sich infolge eines elektrischen Durchbruchs Poren bilden. Obgleich sich die beim elektrischen Durchbruch ablaufenden Prozesse durch die Bildung von Poren mathematisch gut beschreiben lassen (20-22), liegen doch heute eine Reihe von Hinweisen vor, die mit einer elektrischen Porenbildung nicht vereinbar sind (13, 14, 23-26). Abb. 3 zeigt, daß mit Hilfe eines elektrischen Durchbruchs kleinere Zellen durch die Membran einer Wirtszelle hindurchgeschleust werden können, ohne daß die Wirtszelle irreversibel beschädigt wird. Falls das Porenmodell richtig wäre, müßten Poren mit einem Durchmesser von 2 μm und mehr angenommen werden. Bei derartig großen Poren sollte aber die Zellmembran der Wirtszelle aufgrund der Membranspannung mechanisch reißen. Auch der Befund von Vienken et al (26) und von Sowers (25), daß bei der Elektrofusion von Zellen die induzierten lokalen strukturellen Änderungen in den Membranen sich berührender Zellen nicht unbedingt zueinander ausgerichtet sein müssen, spricht gegen eine Porenbildung.

Deshalb erscheint es nicht sinnvoll, Begriffe zu verwenden, die einen hypothetischen Mechanismus implizieren.

Theoretisch läßt sich zeigen (27), daß die Durchbruchspannung bei gegebener äußerer Feldstärke vom Zellradius abhängt und von der Orientierung des jeweilig betrachteten Membranortes auf der Oberfläche in Bezug auf die Feldrichtung (bedingt durch den Kosinus-Term in der Potentialgleichung, Abb. 1).

Dies bedeutet, daß bei gegebenem Zellradius die induzierte Spannung über der Membran und damit der elektrische Durchbruch winkelabhängig ist. In Feldrichtung ist deshalb die Membranspannung am größten, während sie an Stellen, die in einem Winkel von 90° zur Feldrichtung orientiert sind, immer gleich Null ist.

Sukzessive Erhöhung der äußeren Feldstärke führt deshalb zunächst zu einem elektrischen Durchbruch der Membranbereiche, die in Feldrichtung liegen und dann erst – bei höheren Feldstärken – von Membranbereichen, die in einem größeren Winkel zur Feldrichtung orientiert sind. Diese Winkelabhängigkeit der Durchbruchspannung ist in Abb. 1 durch die Bildung entsprechender "Poren" in der Membran anschaulich dargestellt.

Die Permeabilitätserhöhung der Membran, die bei überkritischen Feldstärken beobachtet wird und die für den elektrisch induzierten Transfer von Makromolekülen ausgenutzt wird, geht deshalb zum einen darauf zurück, daß mehr und mehr reversible Störungen in der gesamten Membranoberfläche erzeugt werden, und zum anderen, daß die Membranstörungen in Feldrichtung immer größer werden.

Neueste Untersuchungen von Korenstein und Mitarbeitern (28) und von uns (29, Stopper und Zimmermann, in Vorbereitung) haben gezeigt, daß zusätzlich zu dieser Radius- und Winkelabhängigkeit der Durchbruchspannung eine Asymmetrie des elektrischen Durchbruchs in den beiden Hemisphären der Zelle mit in die Überlegungen einbezogen werden muß. Da das Gesamtpotential das Durchbruchverhalten bestimmt, wird die Durchbruchspannung zunächst für Membrangebiete in der Hemisphäre der Zelle erreicht, bei der der Ruhepotentialgradient die gleiche

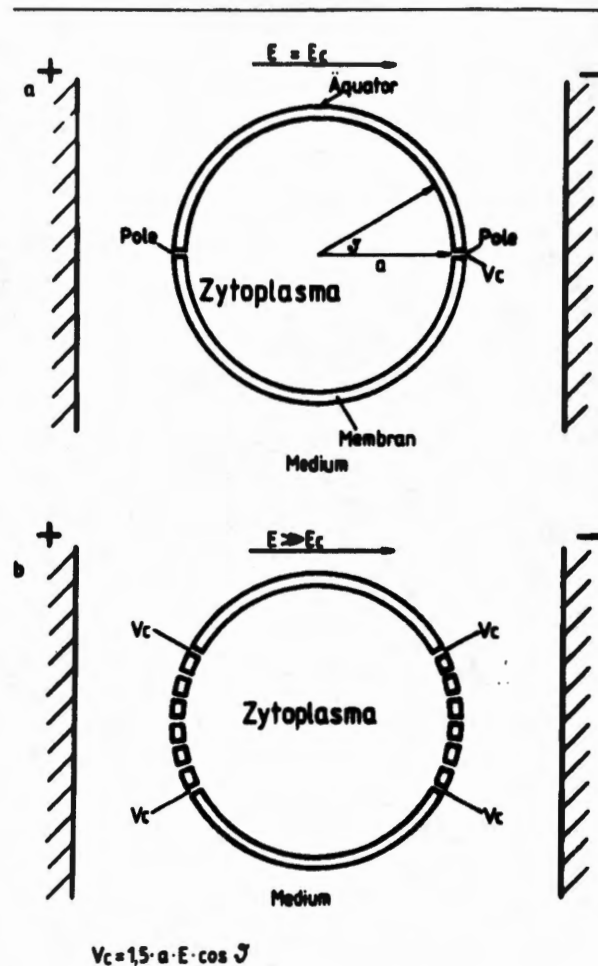


Abb. 1
Schematische Darstellung der Permeabilisierung einer Zelle im elektrischen Feld. Das induzierte Membranpotential, und damit die Durchbruchspannung, V_c , ist bei gegebenem Radius, a , proportional zur äußeren Feldstärke, E (siehe Potentialgleichung unten). Aufgrund der Winkelabhängigkeit (Kosinus-Term) erfolgt der elektrische Durchbruch der Membran bei der kritischen äußeren Feldstärke, E_c , an den »Polen« der Zelle (d. h. in Feldrichtung). Bei überkritischen Feldstärken, $E \gg E_c$, wird die Durchbruchspannung auch für Bereiche »O« erreicht (dargestellt durch Bildung von Poren). Am »Äquator« der Zelle, d. h. rechtwinklig zur Feldrichtung ist das induzierte Membranpotential immer gleich Null.

Richtung aufweist wie der des induzierten Potentials – und erst bei höheren Feldstärken auch in der gegenüberliegenden Hemisphäre, in der die beiden Potentialgradienten antiparallel zueinander liegen (Abb. 2)

Da das natürliche elektrische Feld in der Membran auch durch die Oberflächenladungen bestimmt wird, kann erwartet werden, daß diese asymmetrische Abhängigkeit des Durchbruchs von der Netto-Oberflächenladung auf der Membran abhängt. Diese läßt sich durch proteolytisch wirkende Enzyme, aber auch durch die Ionenstärke in der Lösung, verändern.

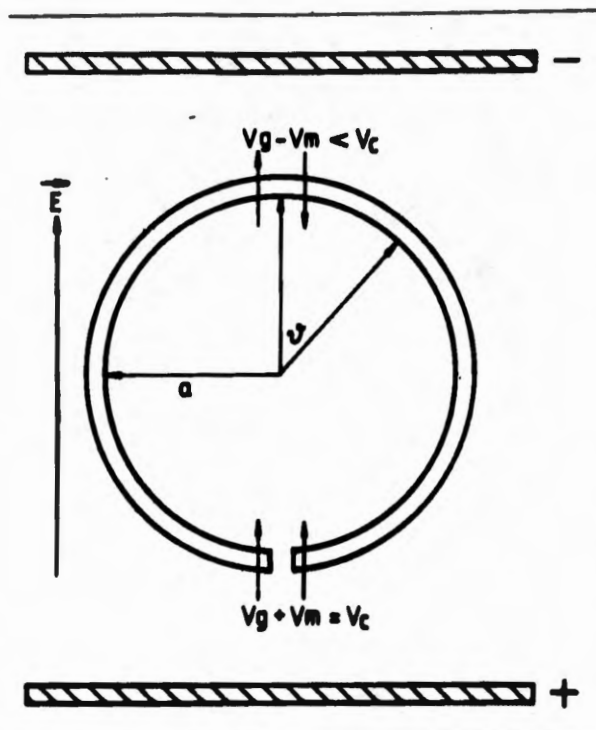


Abb. 2

Im Unterschied zur Abb. 1 wird angenommen, daß in Abwesenheit eines äußeren elektrischen Feldes ein Ruhepotential, V_m , über der Membran anliegt (innen negativ in Bezug auf die Außenlösung). Unter den hier vereinfacht dargestellten Bedingungen (siehe Text) wird das induzierte Potential, V_g , auf der der Anodenseite zugewandten Membranhälfte zum vorhandenen Ruhepotential addiert, während auf der Kathodenseite Subtraktion der beiden Potentiale auftritt. Durchbruch wird deshalb bei der kritischen Feldstärke, E , nur auf der Anodenseite bei $V_g + V_m = V_c$ beobachtet.

Experimentell wurde dies bestätigt (Stopper und Zimmermann, in Vorbereitung).

Abb. 4 zeigt Untersuchungen über die elektrisch induzierte Aufnahme eines Fluoreszenzfarbstoffes in Myelom-Zellen von Mäusen. In Lösungen niedriger Ionenstärke, z.B. isotonen Zuckerlösungen, wie sie bei der konventionellen Elektrofusionsmethode verwendet werden, wird der Farbstoff bevorzugt durch die Hemisphäre aufgenommen, die der Anodenseite zugekehrt ist: bei höherer Ionenstärke (isotone Zuckerlösungen, die etwa 45 mM Elektrolyt, NaCl oder KCl, enthalten) wird symmetrische Aufnahme beobachtet, während bei isotonen Zuckerlösungen, die etwa 70 mM Elektrolyt enthalten, sehr oft erneut asymmetrische Aufnahme, diesmal aber durch die der Kathodenseite zugewandten Hemisphäre, beobachtet wird.

Die bei mittlerer Ionenstärke beobachtete symmetrische Aufnahme kann theoretisch durch die Annahme erklärt werden, daß das natürliche Feld in der Membran gleich Null ist.

Enzymatische Vorbehandlung der Zellen mit Pronase oder Dispase führt zu einer ausgeprägteren asymmetrischen Aufnahme (durch die der Anode zugewandten Hemisphäre) in nichtleitenden und leitenden Lösungen.

Dieser experimentelle Befund zeigt, daß bei Elektropermeabilisierungs-Versuchen die Ionenstärke der Lösung und die enzymatische Vorbehandlung der Zellen entscheidend die Ausbeute des elektrischen Stoff-Transfers durch die Membran mitbestimmen.

Während die Elektrofusion bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann, sollte die Elektropermeabilisierung möglichst bei tieferer Temperatur erfolgen (8, 9, 30-32), und nicht bei 20° C (siehe Neumann et al. 19). Die Ursache hierfür ist darin zu suchen, daß die Lebensdauer der elektrisch induzierten Membran-Permeabilisierung lang genug sein muß, um einen effizienten Stoffaustausch zwischen Zelle und Medium zu ermöglichen (8, 10). Bei höherer Temperatur (d.h. bei Raumtemperatur und insbesondere bei 37°C) laufen die Aushellprozesse in der Membran so schnell ab, daß kein ausreichender Stofftransport durch die permeabilisierte Membran mehr ablaufen kann (9, 10).

Es sei erwähnt, daß dieser Aushellprozeß in den Membranen von benachbarten Zellen bei der Elektrofusion anscheinend nicht ablaufen kann, da nach Durchbruch in der Kontaktzone sich berührender Zellen sofort ein zytoplasmatisches Kontinuum zwischen den beiden Zellen ausgebildet wird (2).

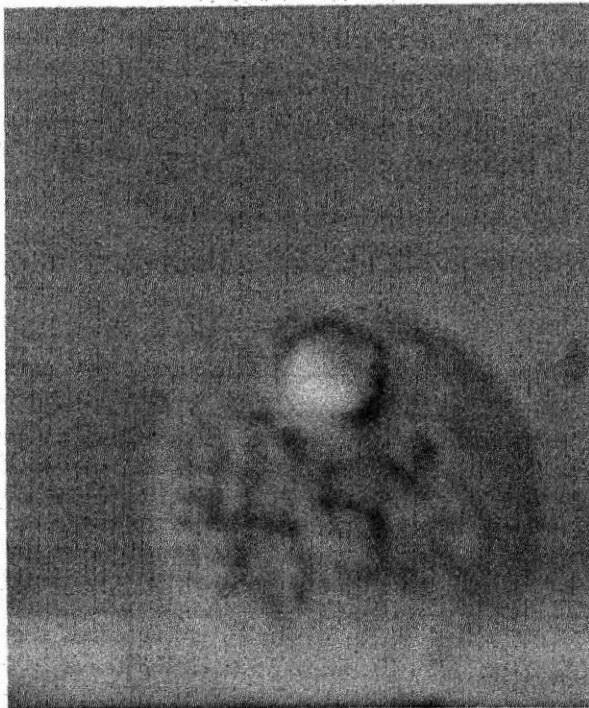
Bei Durchbruch-Experimenten bei tiefer Temperatur muß berücksichtigt werden, daß die elektrische Durchbruchspannung stark temperaturabhängig ist. Bei etwa 4°C liegt die Durchbruchspannung in der Größenordnung von 2 V (33, 34). Entsprechend höhere Feldstärken müssen verwendet werden. Unterhalb von 4°C steigt die Durchbruchspannung extrem an und es kommt, wie Messungen an Riesenalgenzellen (34) und an künstlichen, planaren Lipidmembranen (33) gezeigt haben, zu irreversiblen Änderungen in der Membran. Dies und die Temperaturabhängigkeit der Durchbruchspannung wurde von Potter et al. (35) völlig übersehen, so daß die niedrige DNA-Transfektions-Rate, die von diesen Autoren berichtet wird, verständlich wird.

Weiterhin muß bei Elektropermeabilisierungs-Experimenten berücksichtigt werden, daß es nach elektrischem Durchbruch der Zellmembran nicht nur zu einer Stoffaufnahme in die Zelle kommt, sondern auch zu einer mehr oder minder ausgeprägten Äquilibrierung der intrazellulären Stoffe mit der Außenlösung. Insbesondere kann der Austausch zwischen intrazellulärem Kalium mit extrazellulärem Natrium die Lebensfähigkeit der Zellen empfindlich beeinträchtigen (siehe z.B. 9). Aus diesem Grunde ist es notwendig, erhöhte Kaliumkonzentrationen im Medium, in dem die Feldapplikation durchgeführt wird, vorzugeben. Isotone NaCl-Lösungen, wie sie Neuman et al. (19) verwendet haben, sind in jedem Fall zu vermeiden.

Weiterhin sind die Inkubationszeiten bei 4°C nach der Elektropermeabilisierung auf wenige Minuten zu beschränken, da sonst die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigt wird. Erhöhung der Temperatur etwa 10 Minuten nach Feldapplikation auf 37°C führt, wie bereits erwähnt, zu einem schnellen Aushellen der induzierten strukturellen Änderungen in der Membran (9, 10). Bei Berücksichtigung dieser experimentellen Fakten und theoretischen Überlegungen lassen sich mit Hilfe der von uns entwickelten elektrischen Feldpuls-methode zell-fremde Stoffe in hoher Ausbeute einschließen.



a)

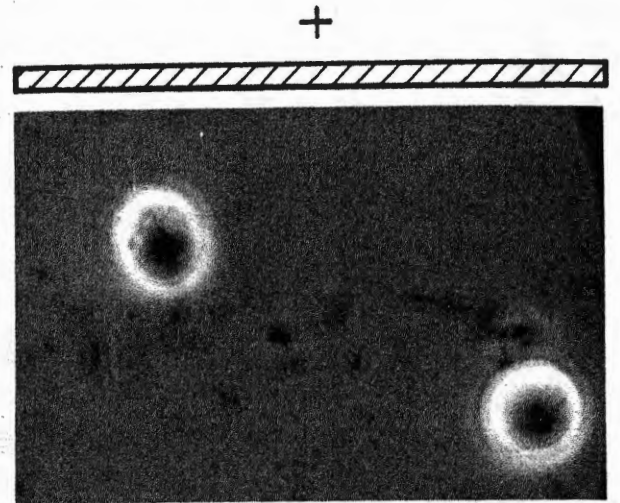


b)

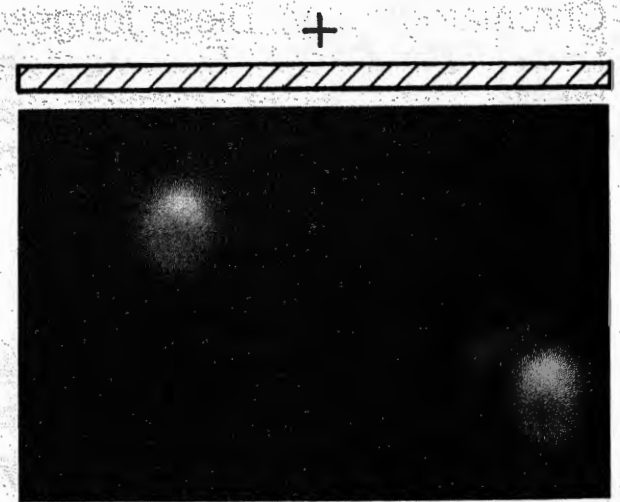
Abb. 3

Feld-induzierte Aufnahme einer intakten Maus-Lymphozytenzelle durch eine Freundzelle. Die Lymphozyten- und die Freundzelle wurden zunächst mit Hilfe der Dielektrophorese (inhomogenes elektrisches Wechselfeld, 1 MHz Frequenz und 200 V/cm Feldstärke) in einen engen Membrankontakt gebracht. Anschließend wurde ein Feldpuls von 20 μ s Dauer und einer Feldstärke von 3,5 kV/cm appliziert. Bei dieser Feldstärke wird die Durchbruchsspannung der Membran der großen Freundzelle, aber nicht die der kleine-

ren Lymphozytenzelle, erreicht. Infolgedessen wird feld-induzierte Aufnahme (Photographie 30 Sekunden nach Feldpuls), nicht aber Fusion, beobachtet. Bei diesem Experiment waren die Zellen in einer isotonen Mannit-Lösung inkubiert.



a)



b)

Abb. 4

Asymmetrische Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid durch die der Anodenseite zugekehrten Hemisphäre einer Maus-Myelom-Zelle. (Feldbedingungen: 3 Pulse im Abstand von je 0.5 Sekunden, Feldstärke 12 kV/cm, 20 μ s Dauer. Nach Behandlung mit Pronase werden die Zellen zum Pulsen in isotone Zuckerlösung mit je 33 mM Kaliumchlorid und Natriumchlorid überführt). Die Aufnahme (a) wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen (Kontrolle), die Aufnahme (b) im Fluoreszenzmikroskop 60 Sekunden nach Applikation des Feldpulses. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 2 und Text.

Zimmermann et al. (9, 12, 30-32, 36, 37) und andere Autoren (38, 39) berichteten in den siebziger Jahren über den Einschluß von Farbstoffen, Pharmaka, Proteinen, Enzymen und Latexpartikeln in Zellen, sowie kürzlich über den Einschluß von DNA in Hefezellen (2) und von ganzen Zellen in Wirtszellen (13,14 und Abb. 3). Der erste Nachweis von DNA-Transfer mit Hilfe dieser elektrischen Methode geht auf Auer et al. (39) zurück. Karube et al. (40) berichteten ebenfalls kürzlich über die erfolgreiche elektrische Transformation von Hefezellen.

Stopper et al. (41) entwickelten ein DNA-Transfektionsprotokoll, das zu einer äußerst effizienten Transformation von tierischen Zellen mit Hilfe der Elektropermeabilisierungsmethode führt.

Diese Autoren führten die elektrisch induzierte DNA-Aufnahme bei 4°C in isotonen Lösungen durch, die 30 mM KCl. c. und eine entsprechende Menge an Inositol enthielten. Die Zellen (Maus L-Zellen) waren mit Dispase vorbehandelt, so daß optimale Durchbruchbedingungen gewährleistet waren (s.w.o.). Die elektrische Transfektion wurde mit dem zyklischen Plasmid pSV2-neo durchgeführt, das zu einer Resistenz gegen das Antibiotikum G-418 führt. Unter diesen Bedingungen konnten etwa 500 Klone von transformierten Zellen (bezogen auf etwa 6×10^6 eingesetzte Zellen) erhalten werden, wobei die Ausbeute von der Feldstärke und der Anzahl der Durchbruchpulse abzuhängen schien.

Zellmembran-Kontakt durch physikalische Kräfte.

Der elektrische Durchbruch von Zellmembranen triggert die Fusion von Zellen, vorausgesetzt, daß die Zellen einen engen Membrankontakt haben. Eine Reihe von Übersichtsartikeln sind, wie bereits erwähnt, über die verschiedenen Aspekte der Elektrofusion veröffentlicht worden, in denen auch die einzelnen Schritte, die bei der Elektrofusion ablaufen, ausführlich diskutiert sind (2, 8-17).

In diesem Artikel möchten sich deshalb die Autoren nur auf eine kurze Zusammenfassung beschränken und vielmehr auf neue Methoden eingehen, mit denen es möglich ist, den für die Fusion notwendigen Membrankontakt zwischen verschiedenen Zellen herzustellen.

Bei der konventionellen Elektrofusionsmethode wird der Zellmembrankontakt über das Phänomen der Dielektrophorese erreicht (Abb. 5). Dieses Phänomen beruht darauf, daß in einem elektrischen Feld, bedingt durch die Ladungstrennung (s.w.o.), ein Dipol entsteht. Wenn das Feld inhomogen ist, wie es z.B. zwischen zwei parallelen zylindrischen Elektroden der Fall ist, wirkt auf den Dipol in der Zelle eine Kraft, die ihn (bzw. die Zelle) in die Richtung höherer Feldstärke (d.h. in Richtung der Elektroden) zieht. Diese Wanderung von Zellen wird auch – im Unterschied zur Elektrophorese – in einem Wechselfeld beobachtet, vorausgesetzt, daß das Feld inhomogen ist. Wenn sich die Zellen bei ihrer Wanderung in Richtung der Elektroden einander nähern, so ziehen sie sich bei einem gewissen Abstand von einigen Mikrometern aufgrund der starken Dipolkräfte an (siehe Abb. 5) und zwar bei geeigneter Feldstärke bis auf einen Abstand von einigen Nanometern.

Elektrischer Durchbruch in der Kontaktzone führt zur Fusion der Zellen. Der gesamte Prozeß der Elektrofusion kann

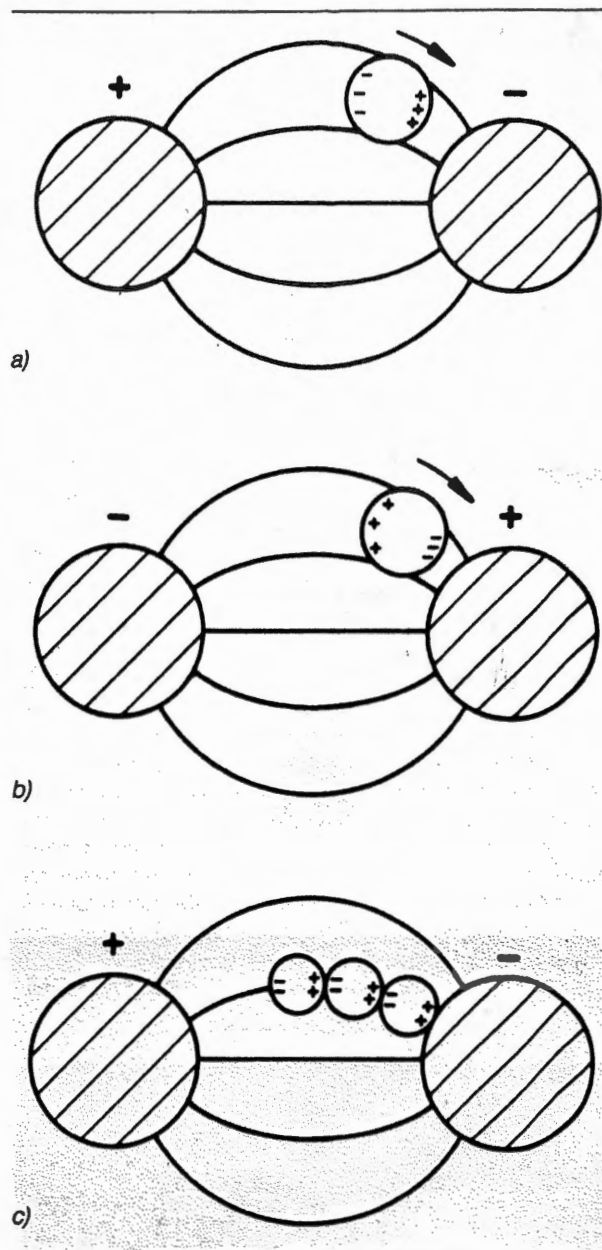
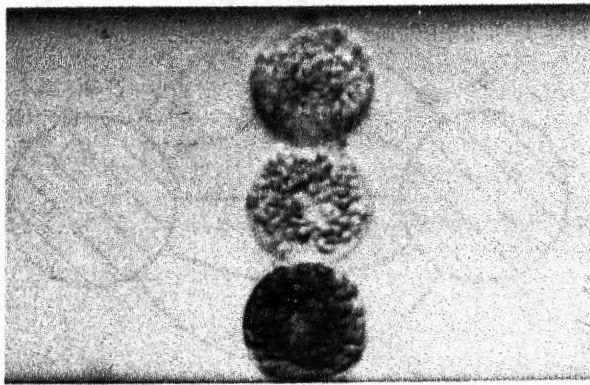


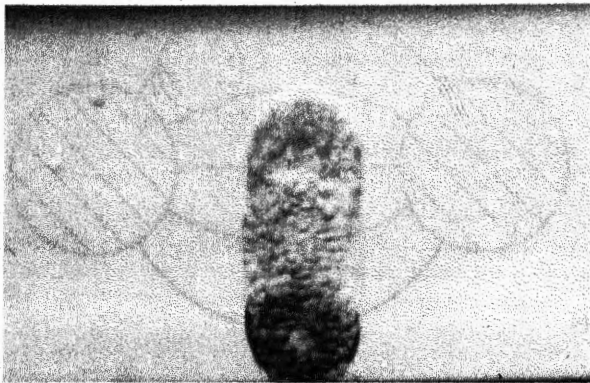
Abb. 5
Perlenkettenbildung von Zellen in einem inhomogenen Wechselfeld zwischen zwei zylindrischen Platinelektroden (Querschnitt), die parallel zueinander angeordnet sind. (a) Polarisation der Zelle im Feld und Wanderung (Dielektrophorese) in Richtung der rechten, negativ geladenen Elektrode; (b) Umkehr der äußeren Feldrichtung: Wanderung der Zelle ebenfalls in Richtung der rechten Elektrode, die nunmehr positiv geladen ist; (c) Anziehung der Zellen untereinander unter Bildung von Ketten.

unter dem Mikroskop verfolgt werden (Abb. 6), die Zahl der zu fusionierenden Zellen läßt sich über die Suspensionsdichte und durch geeignete Elektrodenkammern steuern.

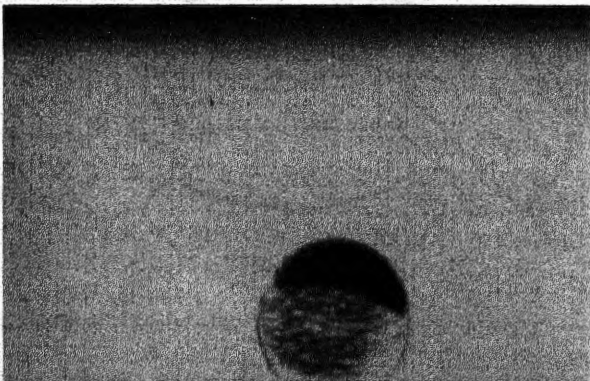
Eine große Zahl von Zellen lassen sich fusionieren bzw. hohe Ausbeuten an Hybriden können erhalten werden, wenn die von der GCA Corporation, Chicago, USA und der Firma Bachofer, Reutlingen, FRG kommerziell zugängli-



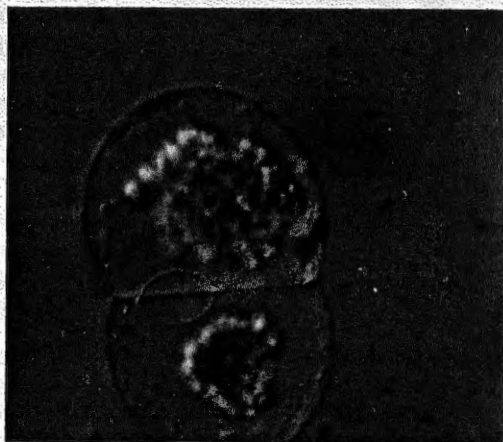
a)



b)



c)



d)

chen Helix- und Rotationskammern verwendet werden (siehe Abb. 7 und Abb. 8, s. w. u.).

Diese Standard-Elektrofusionsmethode ist inzwischen von vielen Laboratorien erfolgreich eingesetzt worden.

Bei dieser Methode wird in der Regel die Fusion der Zellen in schwach leitenden Lösungen (d.h. Lösungen geringer Ionenstärke) durchgeführt, um starke Wärmeentwicklung durch das Wechselfeld zu vermeiden. Derartige Lösungen sind für Zellen nicht schädlich, wenn die Inkubationszeit nicht zu lang 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 in Nähr- oder Selektionsmedien der fusionierten Produkte voraus. Diese Problematik ist bei der Anwendung dieser Methode häufig übersehen worden, insbesondere bei der Fusion von tierischen Zellen (z.B. bei der Produktion von Hybridom-Zellen durch Fusion von Lymphozyten- mit Myelom-Zellen), wenn selbstgebaute Geräte oder andere kommerziell erhältliche Geräte verwendet wurden.

Bei einigen Fragestellungen, insbesondere bei der Fusion von tierischen Zellen, kann es vorteilhaft sein, den Membrankontakt auf anderem physikalischen Wege herzustellen.

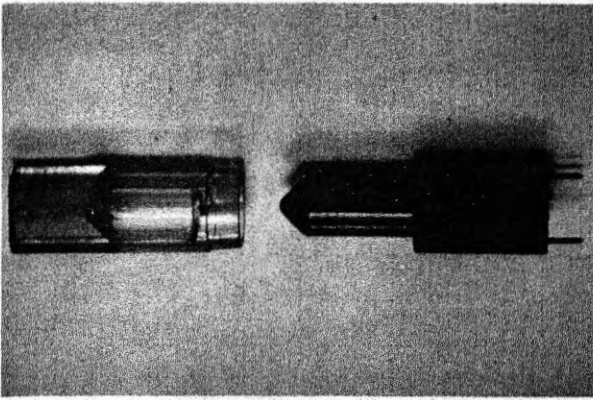
Am einfachsten ist es, wenn Zellen in hoher Suspensionsdichte einem elektrischen Durchbruchspuls von etwa $20 \mu\text{s}$ Dauer ausgesetzt werden. Der mittlere Abstand zwischen den einzelnen Zellen ist unter diesen Bedingungen so gering, daß während des Feldpulses, wie Zimmermann (2) gezeigt hat, Dielektrophorese auftritt, die zur Ausbildung des notwendigen Membrankontaktes führt. Selbst wenn ein geometrisch homogenes elektrisches Feld verwendet wird (z.B. Verwendung eines Plattenkondensators wie bei der Entladungsmethode für die Elektropermeabilisierung von Zellen), so ist doch lokal das Feld durch die hohe Suspensionsdichte so stark inhomogen, daß kurzzeitig bei Applikation von Pulsen hoher Feldintensität (die etwa 10 mal höher ist als bei der normalen Dielektrophorese) erhebliche Wanderungsgeschwindigkeiten und Anziehungskräfte zwischen den Zellen auftreten können.

Auf diesem Weg gelang es Zimmermann und Pilwat (42) erstmalig bei Entladungsversuchen in Erythrozyten-Suspensionen Elektrofusion zwischen Zellen nachzuweisen. Im Prinzip läßt sich Fusion auch in einem Zellpellet durch-

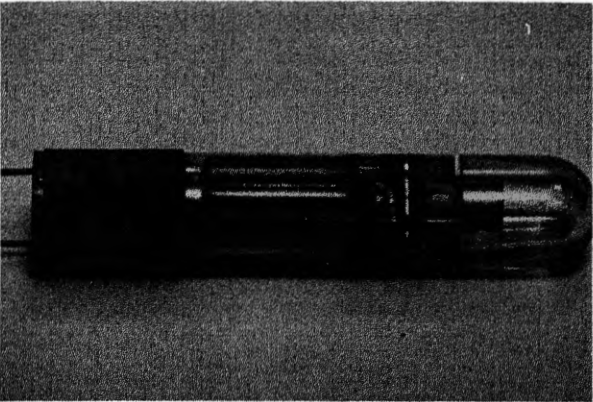
Abb. 6

Elektrofusion zwischen einem grünen Mesophyllprotoplasten und zwei weißen etiolierten Mesophyllprotoplasten von *Avena sativa*. Die Zellen waren in einer isotonen Sorbit-Lösung suspendiert. Aufnahmen von oben nach unten: (a) Kettenbildung durch Dielektrophorese (1 MHz Frequenz, 75 V/cm Feldstärke); (b) 30 Sekunden nach Applikation eines Feldpulses (750 V/cm , $20 \mu\text{s}$ Dauer) und (c) 10 Minuten nach Feldapplikation. In der fusionierten Zelle vermischen sich anscheinend die Zellinhalte der verschiedenen, individuellen Zellen nicht sofort.

Unterste Aufnahme (d): Vesikelbildung in der Kontaktzone während der Fusion von zwei Mesophyllprotoplasten von *Kalanchoë daigremontiana* (Aufnahme 5 Minuten nach Feldpulsapplikation (1 kV/cm , $15 \mu\text{s}$ Dauer) (Hampp und Zimmermann)



a)



b)

Abb. 7 Helix-Fusionskammer

Die Kammer besteht aus zwei Teilen (a), einem äußeren Mantelgefäß, in das die Zellsuspension pipettiert wird, und einem inneren zylindrischen Tubus. 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. Der Tubus wird vorsichtig in das Außenmantelgefäß eingeführt (b); die Zellen und die Lösung steigen im Zwischenraum zwischen äußerer und innerer 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 Ventiles am Boden in ein Gefäß zentrifugiert, das Nährmedium enthält.

führen, d.h. unter Bedingungen, bei denen der Zellabstand praktisch gleich Null ist (2). Auch dies führt zur Bildung von Hefehybriden und Hybridom-Zellen; allerdings sind zur Zeit noch die Ausbeuten geringer als bei Verwendung der Standard-Elektrofusionsmethode.

Höhere Ausbeuten an Hefehybriden und an Hybridom-Zellen werden dagegen erhalten, wenn Zellen bei niedriger Suspensionsdichte bzw. bei hoher Verdünnung zunächst einer Folge von dielektrischen Durchbruchspulsen ausgesetzt werden, um dann anschließend abzentrifugiert zu werden. Die Fusion läuft dann zwischen den Zellen im Pellet ab (17). Dieses Verfahren könnte möglicherweise im Ge-

gensatz 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.

Senda et al (43) fusionierten zwei pflanzliche Protoplasten, die mit Mikropipetten mechanisch in Berührung gebracht wurden. Allerdings übersahen die Autoren, daß die Dauer des Feldpulses zu lang war (Millisekunden-Bereich), so daß die fusionierten Zellen nicht lebensfähig waren. Dieses Verfahren ist auf wenige Zellen beschränkt.

Interessanter erscheint das Membranverfahren (17), bei dem die jeweiligen Elternzellen auf die Oberfläche zweier Membranen (Filter) adsorbiert werden (entweder elektrostatisch oder chemisch, oder durch Ansaugen in Poren, die einen etwas kleineren Durchmesser als die Zellen aufweisen). Die beiden Membranen (oder Filter) werden in einem Plattenkondensator (Entladungskammer) mechanisch auf eine so kurze Distanz gebracht, daß die Zellen sich entweder berühren oder durch Dielektrophorese in Kontakt gebracht werden. Applikation von Durchbruchspulsen führt zur Fusion der Zellen mit hohen Ausbeuten an Hybriden (nachgewiesen für Hefezellen und Hybridom-Zellen).

Ein technisch ebenfalls interessantes Verfahren stellt die Magneto-Elektrofusion dar (44). 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, das sich zwischen zwei parallelen Elektroden befindet, konzentriert. Die magnetische Kraft, die in das Zentrum zwischen den Elektroden gerichtet ist, ist genügend groß, um einen ausreichenden Membrankontakt zwischen den Zellen zu ermöglichen. Elektrofusion von Erythrozyten und Hefezellen in hoher Ausbeute mit Hilfe der Magneto-Elektrofusion wurde von Kramer et al (44) beschrieben. Der Vorteil dieses

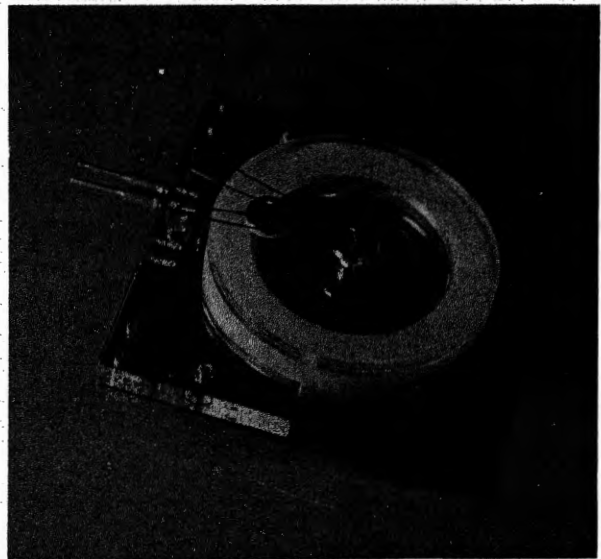


Abb. 8 Rotationskammer

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.

Verfahrens ist es, daß in leitenden Lösungen fusioniert werden kann und daß die entstehenden Produkte relativ einfach über Magnete abgetrennt werden können. Das Verfahren beruht darauf, daß während der magneto-elektrischen Fusion magnetische Teilchen in das Zellinnere mit eingeschlossen werden. Da die an die äußere Oberfläche adsorbierten magnetischen Teilchen über Waschvorgänge relativ einfach entfernt werden können, können die Fusionsprodukte magnetisch anschließend abgetrennt werden.

Dieses Magneto-Elektrofusionsverfahren könnte besonders dann technisch interessant werden, wenn keine Zellen mit genetischen Markern vorliegen (z.B.: bei der Fusion von einigen technisch interessanten Hefestämmen).

Ein vom technischen Standpunkt aus ebenfalls interessantes Verfahren dürfte das von uns vor kurzem entwickelte Elektro-Akustische Verfahren sein (45). In einem Schallfeld treten ganz analoge Kräfte wie bei der Dielektrophorese auf, nur daß im Unterschied zur Dielektrophorese nicht die dielektrischen Eigenschaften der Zelle und der Lösung eingehen, sondern die Dichteunterschiede.

In einem Ultraschallfeld lassen sich auf diese Weise ebenfalls Perlenketten von Zellen bilden. Vienken et al (45) verwendeten stehende Wellen. Unter diesen Bedingungen bilden sich Druckmaxima aus, in denen sich die Zellen unter Ausbildung eines engen Membrankontaktes konzentrieren. Bei der Verwendung eines Ultraschallfeldes von 1 MHz Frequenz konnten auf diese Weise Erythrozyten 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.

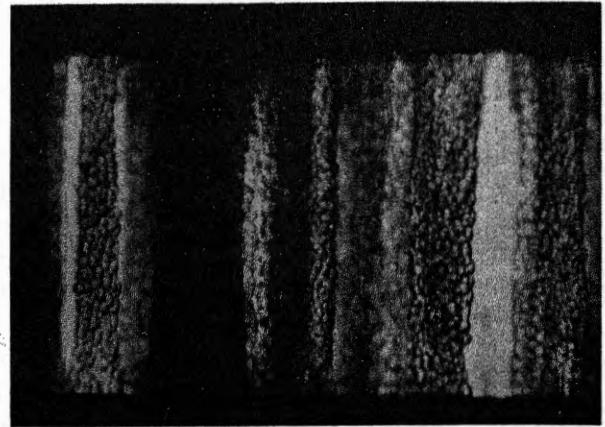
Der Vollständigkeit halber soll noch erwähnt werden, daß einige Autoren (z. B. 46) Chemikalien, wie Polyäthylenglykol, zur Herstellung eines Membrankontaktes verwendet haben. Die Fusion erfolgte dann ebenfalls mit einem Feldpuls. Dieses Verfahren dürfte gegenüber den chemischen Fusionsverfahren, die ebenfalls meistens Polyäthylenglykol verwenden, keine großen Vorteile aufweisen, da der Fusionsprozeß nicht kontrolliert werden kann. Interessanter ist das Verfahren von Lo et al. (47). Diese Autoren verwendeten eine spezifische Avidin-Biotin-Bindung zwischen Lymphozyten und Myelom-Zellen und konnten so, nach Applikation des Durchbruchspulses, Hybridom-Zellen gewinnen.

Elektrofusion

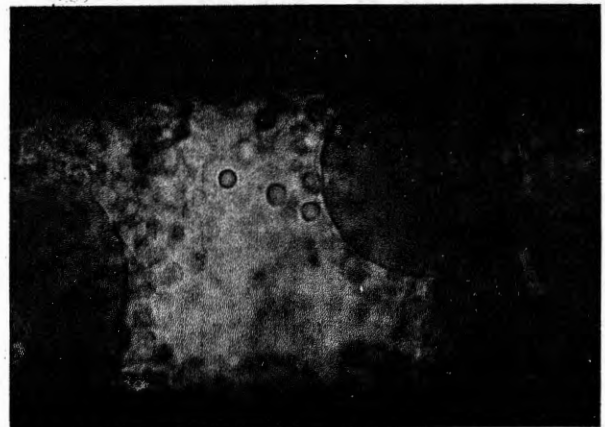
Inzwischen liegen so viele Untersuchungen über Elektrofusion von Zellen vor, daß mit Recht gesagt werden kann, daß diese Methode sich universell für die Fusion von Zellen und künstlichen Lipid-Systemen einsetzen läßt.

Melkyan et al (48) berichteten über die Elektrofusion von zwei planaren Lipidmembranen und Büschl et al. (49) über die Elektrofusion von Liposomen unterschiedlichster Zusammensetzung. Büschl (50) gelang es ebenfalls, Zellen mit Liposomen elektrisch zu verschmelzen.

Ruthe und Adler (51) beschrieben vor kurzem die erste erfolgreiche Elektrofusion von Bakterien, wobei Hybride erhalten wurden, die die Eigenschaften beider Eltern enthielten. Hefezellen lassen sich besonders gut mit dem elektrischen Verfahren unter hoher Ausbeute fusionieren.



a)



b)

Abb. 9

Elektrofusion von menschlichen Erythrozyten. (a): Zell-Kettenbildung zwischen zwei parallelen, zylindrischen Elektroden (Abstand $200 \mu\text{m}$, 1 MHz Frequenz, 400 V/cm Feldstärke).

(b): Nach Feldapplikation (6 kV/cm Feldstärke und $3 \mu\text{s}$ Dauer) entstehen Riesenzellen. (Im Hintergrund sind nicht-fusionierte Zellen zu sehen!)

Schnettler und Zimmermann (52) haben gezeigt, daß vor allem die Zusammensetzung des Fusionsmediums über die Ausbeute an Hybriden entscheidet. Diese Autoren zeigten, daß insbesondere geringe Konzentrationen an Calcium- und Magnesium-Acetat sowie an Albumin notwendig sind, um hohe Ausbeuten an teilungsfähigen Hybriden zu erhalten. In diesen Versuchen wurde auch erstmalig ein Plasmid über Elektrofusion in eine Zelle eines anderen Zellstammes übertragen.

Sehr viele Arbeiten liegen heute über die Fusion von pflanzlichen Protoplasten vor (53, 54) (siehe Abb. 6). Verschiedene Autoren konnten inzwischen auch zeigen, daß die elektrisch gebildeten Hybride zum Kallus-Stadium bzw. bis zur ganzen Pflanze regeneriert werden können (55-57).

Hampp et al. (58) berichteten in diesem Zusammenhang über die erfolgreiche Fusionierung von evakuolierten pflanzlichen Protoplasten. Es besteht die berechtigte Hoffnung, daß vakuolenfreie fusionierte Protoplasten in Zukunft besser regeneriert werden können als vakuolenhaltige.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben inzwischen gezeigt – nach den ersten Mitteilungen von Zimmermann und Mitarbeitern –, daß auch tierische Zellen miteinander fusioniert werden können, wobei lebensfähige Hybride erhalten wurden (2, 8–17, 59, 60). Bei einigen dieser Arbeiten wurden Chemikalien zur Herstellung des Membrankontaktes verwendet (61), oder die Elektrofusion wurde an konfluenten Zellen durchgeführt (62).

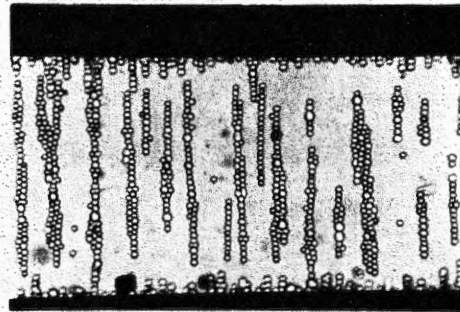
Die Ausbeute an Hybridom-Zellen konnte durch das Elektrofusionsverfahren gegenüber den chemischen Verfahren erheblich gesteigert werden. Vienken und Zimmermann (63) zeigten, daß – wie bei der Fusion von Hefezellen – divalente Kationen wichtig sind, und daß es im Falle der Elektrofusion von Lymphozyten mit Myelom-Zellen wichtig ist, daß die Zellen nach der Elektrofusion zunächst in einem Nachbehandlungsmedium inkubiert werden, (das erhöhte Kalium-Konzentration enthält), bevor das Selektionsmedium zugegeben wird. Auch der Nachweis, daß diese Hybridom-Zellen monoklonale Antikörper produzieren, liegt inzwischen vor (64).

Eizellen können ebenfalls miteinander fusioniert werden, wobei anschließende Befruchtung und Teilung beobachtet wurde (65). Erwähnenswert ist auch, daß es mit Hilfe des Elektrofusionsverfahrens möglich ist, tausende von Zellen miteinander zu verschmelzen, so daß Riesenzellen gebildet werden (Abb. 9 und Abb. 10). Diese Riesenzellen könnten interessante Untersuchungsobjekte für die Membranforschung darstellen, da Mikroelektroden in sie eingeführt werden können.

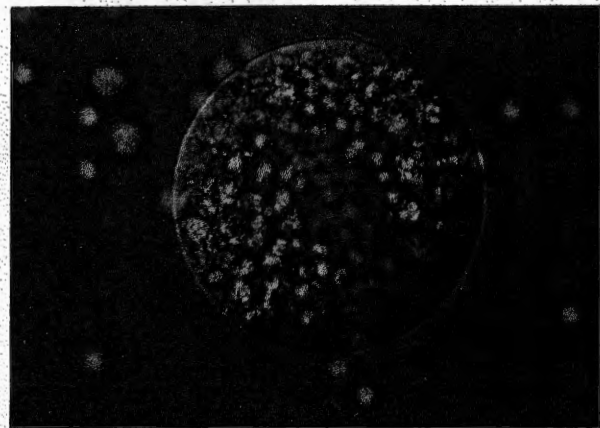
Der kontrollierte Ablauf der Elektrofusion erlaubt darüber hinaus – in Kombination mit anderen Techniken, wie z.B. der Elektronen- und der Fluoreszenzmikroskopie – Membranprozesse und Membraneigenschaften zu studieren. Hierzu liegen inzwischen interessante Arbeiten aus der Gruppe von Sowers (66–68) vor. Da die Fusion synchron abläuft, können ebenfalls einzelne Schritte während des Verschmelzungsvorganges mikroskopisch verfolgt werden. Derartige Untersuchungen haben gezeigt, daß das überschüssige Membranmaterial über die Bildung von Vesikeln in der Kontaktzone entfernt wird (69, Abb. 6).

Schlußfolgerung

Der jetzige Stand der Technik zeigt, daß das Elektrofusionsverfahren mit seinen vielfältigen Alternativen und das Elektropermeabilitäts-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 Industrie-Laboratorien diese neuen Techniken aufgegriffen haben, unterstreicht diese Annahme. Interessant ist es allerdings – insbesondere vom Standpunkt der Forschungsförderung – festzustellen, daß die gesamten theoretischen Grundlagen und die grundlegenden Experimente teilweise bis zu 10 Jahre und mehr zurückliegen, und daß sie 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 stark biochemisch ausgerichtet sind, immer noch auf erhebliche Schwierigkeiten stößt. Wünschenswert wäre es, wenn auf diesem interdisziplinären



a)



b)

Abb. 10 Elektrofusion von Friendzellen

(a): Dielektrophorese und Zellkettenbildung in einem inhomogenen Wechselfeld zwischen zwei zylindrischen Platinelektroden (100 V/cm, 2 MHz).

(b): Bildung einer Riesenzelle, 10 Minuten nach Applikation des Feldpulses (2 kV/cm, 20 μ s).

Gebiet in Zukunft Physiker mit Biologen und Biotechnologen mehr kooperieren würden.

Danksagung

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

Literatur:

1. Bio-Technologie (K. Dohmen, Hrsg.), J. B. Metzler-Verlag, Stuttgart (1983)
2. U. Zimmermann, Biochim. Biophys. Acta 694, 227 (1982)
3. U. Zimmermann, J. Schulz und G. Pilwat, Biophys. J. 13, 1005 (1973)
4. E. Neumann und K. Rosenheck, J. Membrane Biol. 10, 279 (1972)
5. T. Y. Tsong und E. Kingsley, J. Biol. Chem. 250, 786 (1975)
6. E. Neumann und K. Rosenheck, J. Membrane Biol., 32, 231 (1977)

7. K. Kinosita, Jr. und T. Y. Tsong, *Nature* 272, 258 (1978)
8. U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Beckers und F. Riemann, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 3, 58 (1976)
9. U. Zimmermann, J. Vienken und G. Pilwat, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7, 553 (1980)
10. U. Zimmermann, P. Scheurich, G. Pilwat und R. Benz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20, 325 (1981)
11. U. Zimmermann und J. Vienken, *J. Membrane Biol.* 67, 165 (1982)
12. U. Zimmermann, in: *Targeted Drugs* (E. Goldberg Hrsg.), 153, John Wiley & Sons Inc. (1983)
13. U. Zimmermann, *Trends in Biotechnology*, 1, 149 (1983)
14. U. Zimmermann, J. Vienken und G. Pilwat, in: *Microtechniques in Medicine and Biology* (J. Chajen und L. Bitensky, Hrsg.), Vol. 1, p. 89, Marcel Dekker, Inc., New York und Basel (1984)
15. U. Zimmermann, K.-H. Büchner und W. M. Arnold, in: *Charge and Field Effects in Biosystems* (M. J. Allen und P. N. R. Usherwoold, Hrsg.), p. 293, Abacus Press (1984)
16. W. M. Arnold und U. Zimmermann, in: *Biological Membranes* (D. Chapman, Hrsg.), Vol. 5, p. 381, Academic Press, London (1983)
17. U. Zimmermann, J. Vienken, J. Halfmann und 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)
18. U. Zimmermann, G. Pilwat und F. Riemann, *Z. Naturforsch.* 29c, 304 (1974)
19. E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang und P. H. Hofschneider, *EMBO J.*, 1, 841 (1982)
20. I. G. Abidor, V. B. Arakelyan, L. V. Chernomordik, Yu. A. Chizmadzhev, V. F. Pastushenko und M. R. Tarasevich, *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 6, 37 (1979)
21. A. G. Petrov, M. D. Mitov und A. I. Derzhanski, *Adv. in: Liquid Crystal Research and Applications*, (Lajos Bata Hrsg.) Pergamon Press, Oxford-Akademiai Kiado, Budapest (1980)
22. D. S. Dimitrov und R. K. Jain, *Biochim. Biophys. Acta* 779, 437 (1984)
23. U. Zimmermann, G. Küppers und N. Salhani, *Naturwissenschaften*, 69, 451 (1982)
24. V. Dressler, K. Schwister, C. W. M. Haest und B. Deuticke, *Biochim. Biophys. Acta* 732, 304 (1983)
25. A. E. Sowers *J. Cell Biol.* 99, 1989 (1984)
26. J. Vienken, U. Zimmermann, M. Fouchard und D. Zagury, *FEBS Lett.* 163, 54 (1983)
27. E. Jeltsch und U. Zimmermann, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6, 349 (1979)
28. D. L. Farkas, R. Korenstein and S. Malkin, *FEBS Lett.* 120, 236 (1980)
29. W. Mehrle, U. Zimmermann und R. Hampp, *FEBS Lett.* 185, 89 (1985)
30. U. Zimmermann, G. Pilwat und F. Riemann, *Deutsches Patent No. 2405119*, eingereicht 2. Februar, 1974; *Britisches Patent No. 1481 480*; *U. S. Patent No. 4081340* und *Französisches Patent No. 75 02743*
31. U. Zimmermann, G. Pilwat und F. Riemann, *Biochim. Biophys. Acta* 375, 209 (1975)
32. U. Zimmermann, F. Riemann und G. Pilwat, *Biochim. Biophys. Acta* 436, 460 (1976)
33. R. Benz, F. Beckers und U. Zimmermann, *J. Membrane Biol.* 48, 181 (1979)
34. H. G. L. Coster und U. Zimmermann, *J. Membrane Biol.* 22, 73 (1975)
35. H. Potter, L. Weir und P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81, 7161 (1984)
36. U. Zimmermann und G. Pilwat, *Z. Naturforsch.* 31c, 732 (1976)
37. J. Vienken, E. Jeltsch und U. Zimmermann, *Cytobiology* 17, 182 (1978)
38. W. Schüssler und G. Ruhenstroth-Bauer, *Blut* 49, 213 (1984)
39. D. Auer, G. Brandner und W. Bodemer, *Naturwissenschaften* 63, 391 (1976)
40. I. Karube, E. Tamiya und H. Matsuoka, *FEBS Lett.* 182, 90 (1985)
41. H. Stopper, U. Zimmermann und E. Wecker, *Z. Naturforsch., im Druck*
42. U. Zimmermann und G. Pilwat, *Sixth Int. Biophys. Cong. Kyoto, Abstr. IV-19 (H)*, 140 (1978)
43. M. Senda, J. Takeda, S. Abe und T. Nakamura, *Plant Cell Physiol.* 20, 1441 (1979)
44. I. Kramer, K. Vienken, J. Vienken und U. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta* 772, 407 (1984)
45. J. Vienken, U. Zimmermann, H. P. Zenner, W. T. Coakley und R. K. Gould, *Naturwissenschaften*, 72, 441 (1985)
46. H. Weber, W. Förster, H.-E. Jacob und H. Berg, in: *Current Developments in Yeast Research* (G. G. Stewart und I. Russel, Hrsg.), p. 219, Pergamon, Toronto und New York (1981)
47. M. M. S. Lo, T. Y. Tsong, M. K. Conrad, S. M. Strittmatter, L. D. Hester und S. H. Snyder, *Nature* 310, 792 (1984)
48. G. B. Melikyan, I. G. Abidor, L. V. Chernomordik und L. M. Chailakhyan, *Biochim. Biophys. Acta* 730, 395 (1983)
49. R. Büschl, H. Ringsdorf und U. Zimmermann, *FEBS Lett.* 150, 38 (1982)
50. R. Büschl, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz (1984)
51. H.-J. Ruthe und J. Adler, *Biochim. Biophys. Acta*, im Druck
52. R. Schnettler und U. Zimmermann, *FEMS Microbiol. Lett.* 27, 195 (1985)
53. N. Saga, M. Poine-Fuller und A. Gibor, *Proceedings of a Workshop on the Present Status and Future Directions for Biotechnologies Based on Algal Biomass Production*, Univ. Colorado Press, Boulder (1984)
54. G. Bates, J. Gaynor und N. Shetzhawat, *Plant Physiol.* 72, 1110 (1983)
55. G. W. Bates und C. A. Hasenkampf, *Theor. Appl. Genet.* 70, 227 (1985)
56. H. U. Koop, J. Dirk, D. Wolff und H. G. Schweiger, *Cell Biol. Int. Rep.* 7, No. 12 (1983)
57. H. Kohn, R. Schieder und O. Schieder, *Plant Sci. Lett.*, im Druck (1985)
58. R. Hampp, M. Steingraber, W. Mehrle und U. Zimmermann, *Naturwissenschaften* 72, 91 (1985)
59. T. Ohno-Shosaku, H. Hama-Inaba und Y. Okada, *Cell. Struct. Funct.* 9, 193 (1984)
60. T. Ohno-Shosaku und Y. Okada, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 120, 138, (1984)
61. M. Capel, J. Teissie und G. Alibert, *FEBS Lett.* 173, 331, (1984)
62. C. Blangero und J. Teissie, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 114, 663 (1983)
63. J. Vienken und U. Zimmermann, *FEBS Lett.* 182, 278 (1985)
64. S. M. Brown, Q. F. Ahkong, A. D. Sage und J. A. Lucy, *Biochem. Soc. Trans.*, im Druck (1986)
65. H.-P. Richter, P. Scheurich und U. Zimmermann, *Develop. Growth and Differ.*, 23 (5), 479 (1981)
66. A. E. Sowers, *Biochim. Biophys. Acta* 735, 426 (1983)
67. A. E. Sowers, *J. Cell Biol.* 99, 1989 (1984)
68. A. E. Sowers, *Biophys. J.* 47, 519 (1985)
69. J. Vienken, U. Zimmermann, R. Ganser und R. Hampp, *Planta* 157, 331 (1983)