

- [175] Vgl. a) T. Shimidzu, *Adv. Polym. Sci.* 23, 55 (1977); b) H. J. Fendler, E. J. Fendler: *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*. Academic Press, New York 1975. c) R. A. Moss, Y. S. Lee, K. W. Alwis, *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6646 (1980).
- [176] a) T. S. Chang, *Science* 146, 524 (1964); b) J. Kreuter, *Pharm. Acta Helv.* 53, 33 (1978); c) Y. T. Yu, T. M. S. Chang, *Biomater., Med. Devices, Artif. Organs* 8, 273 (1980); d) M. F. Lim, A. M. Sun, *Science* 210, 908 (1980); e) N. Sliwka, *Angew. Chem.* 87, 556 (1975); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14, 539 (1975).
- [177] G. Weissmann, R. Claiborne: *Cell Membranes - Biochemistry, Cell Biology and Pathology*. H. P. Publishing, New York 1975.
- [178] H. Fischer, E. Rüde, D. Sellin, *Naturwissenschaften* 57, 507 (1970).
- [179] K. Dose, Th. Nawroth, N. Wagner, persönliche Mitteilung.
- [180] U. Zimmermann, J. Schultz, G. Pilwat, *Biophys. J.* 13, 1005 (1973).
- [181] P. Scheurich, U. Zimmermann, M. Mischel, J. Lamprecht, *Z. Naturforsch. C* 35, 1081 (1980).
- [182] N. J. Harper, *J. Med. Pharm. Chem.* 1, 467 (1959).
- [183] Für die freundliche Überlassung des Originals danken wir Professor H. von Saalfeld vom Fachbereich Kunsterziehung der Universität Mainz recht herzlich.

Zellen mit manipulierten Funktionen: Neue Perspektiven für Zellbiologie, Medizin und Technik

Von Ulrich Zimmermann, Peter Scheurich, Günter Pilwat und Roland Benz^[*]

Die elektrische Leitfähigkeit und Permeabilität einer Zellmembran, die den Stoff- und Informationsaustausch zwischen Zelle und Umgebung reguliert und steuert, läßt sich durch elektrische Felder reversibel erhöhen. Wenn Zellmembranen (oder auch künstliche Lipidmembranen) einem Feldpuls hoher Intensität und kurzer Dauer (ns bis μ s) ausgesetzt werden, kommt es zu einem lokalen elektrischen Durchbruch der Membran. Der elektrische Durchbruch ist mit einer so großen Permeabilitätsänderung der Membran verbunden, daß normalerweise membran-impermeable Substanzen und Teilchen (bis zur Größe von Genen) in die Zelle geschleust werden können. Die ursprünglichen Eigenschaften der Membran regenerieren sich – je nach Bedingungen – innerhalb von μ s bis min. Der elektrische Durchbruch in der Membrankontaktzone von Zellen (oder Lipidvesikeln), die durch Einwirkung schwacher, inhomogener elektrischer Wechselfelder aneinandergelagert worden sind, führt zur Verschmelzung (Fusion) dieser Zellen. Dabei bildet sich eine Zelle mit neuen funktionellen Eigenschaften. Das Fusionsverfahren ist sehr schonend, und die Ausbeute an fusionierten Zellen ist hoch. Die elektrisch induzierte Fusion und die Einschleusung von membran-impermeablen Substanzen und Genen in Zellen ermöglichen es, eine Vielfalt von Zellen mit manipulierten Funktionen zu gewinnen, mit denen viele Probleme der Zellbiologie, Medizin und Technik gelöst werden können (oder bereits gelöst worden sind). Diskutiert werden die Anwendungen des elektrischen Durchbruches der Membran für die klinische Diagnostik, die Entwicklung von zellulären Trägersystemen für den selektiven Transport von Pharmaka zu einem Wirkungsort im Organismus und die potentiellen Möglichkeiten der elektrisch induzierten Fusion zur Züchtung von salztoleranten Kulturpflanzen, zur Umwandlung von Kohlendioxid und Wasser mit Sonnenenergie in Ethanol, zur Synthese von Naturstoffen und zur Genmanipulation.

1. Einleitung

Die zunehmende Nachfrage nach hochwertigen Naturstoffen und Pharmaka für medizinische und technische Anwendungen sowie die immer drängender werdenden Probleme einer ausreichenden Ernährung und Energieversorgung der Weltbevölkerung haben in den letzten Jahren dazu geführt, verstärkt nach neuen Technologien unter Verwendung von biologischen Systemen zu suchen. Dieses interdisziplinäre Forschungsgebiet, das Teilbereiche aus Chemie, Physik,

Biologie und Medizin umfaßt, wird als Biotechnologie bezeichnet. Die industrielle Anwendung von Mikroorganismen für die Herstellung von medizinisch und technisch interessanten Wirkstoffen und Pharmaka hat bereits beachtliche Erfolge zu verzeichnen, obgleich dieses Gebiet sicherlich noch in den Anfängen steckt^[1].

Die Entwicklung der Photosynthese im Verlauf der Evolution ermöglicht es pflanzlichen Zellen, solare Energie mit einem hohen Wirkungsgrad in chemische Energie umzuwandeln, die ihrerseits von anderen Zellen und Organismen in osmotische, mechanische und elektrische Arbeit umgewandelt werden kann. Technisch sind wir jedoch vom Ziel der Sonnenenergiekonversion noch weit entfernt.

Viele Organismen wie Algen und Bakterien haben das Problem gelöst, in salzhaltiger Umgebung optimal zu leben, d. h., zu wachsen und sich zu vermehren. Die Salzadaptation von Kulturpflanzen in Verbindung mit einer Bewässerung

[*] Prof. Dr. U. Zimmermann, Dr. P. Scheurich, Dr. G. Pilwat
Arbeitsgruppe Membranforschung am Institut für Medizin
der Kernforschungsanlage
Postfach 1913, D-5170 Jülich 1
Priv.-Doz. Dr. R. Benz
Fakultät für Biologie der Universität
D-7750 Konstanz

von Böden in ariden Zonen mit Meer- oder Brackwasser könnte einen entscheidenden Beitrag zur Lösung des Ernährungsproblems der Menschheit leisten^[2]; die ariden Zonen machen mehr als 40% der Landmasse der Erde aus.

Ein anderer Weg zur Lösung dieses Problems ist die Züchtung von Sorten, die unter ungünstigen Bedingungen hohe Erträge liefern. Solche Hochleistungssorten erfordern eine hohe Stickstoffdüngung. Abgesehen von Umweltbelastungen durch Düngung ist die Energie, die heute schon für die Produktion mineralischer Stickstoffdünger aufgewendet wird, beträchtlich. Ein möglicher Ausweg wäre die Stickstofffixierung auf biologischem Wege, d. h., mit Zellen von Kulturpflanzen, die so manipuliert worden sind, daß sie wie einige Bakterien direkt den Luftstickstoff binden und umsetzen können^[3].

Die technologische Anwendung biologischer Systeme zur Lösung des Ernährungs- und Energieproblems sowie zur Lösung medizinischer Probleme erfordert deshalb im Regelfall eine Manipulierung und Modifizierung des Funktionsspektrums auf zellulärer Basis. Eine zentrale Rolle bei derartigen Überlegungen spielt die Zellmembran, das Plasmalemma. Diese Lipid-Protein-Membran, die nur 10 nm dick ist, regelt den Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung. Ihre Selektivität, ihre Filter- und Ventileigenschaften sowie das Vorhandensein von spezifischen Transportsystemen (carriern) für bestimmte Zucker, Aminosäuren und Ionen ermöglichen es der Zelle, ein Milieu einzustellen, das sich von dem der Außenlösung beträchtlich unterscheidet. Zusätzliche intrazelluläre Kompartimentierung durch analog aufgebaute Membranen (Mitochondrien, Chloroplasten, Kern etc.) schafft die Voraussetzungen, daß zahlreiche biochemische und biophysikalische Reaktionen auf kleinstem Raum ablaufen können^[4,5].

Im Prinzip läßt sich das Funktionsspektrum einer Zelle manipulieren, wenn es gelingt, durch die Plasma-Membran Gene oder nichttoxische Substanzen einzuschleusen, für die die Membran normalerweise impermeabel ist. Die Genmanipulation in Mikroorganismen (Prokaryonten) hat in jüngster Zeit bereits erste bahnbrechende Erfolge erzielt, obgleich die Übertragung des für die Stickstoffbindung zuständigen Gens aus Bakterien in höhere Pflanzen noch nicht gelungen ist^[1].

Die Verschmelzung (Fusion) von Zellen oder Zellkernen mit unterschiedlichen Eigenschaften und unterschiedlicher Herkunft zu neuen Zellsystemen ist eine zweite Variante der Genmanipulation, um Zellen mit den geforderten Eigenschaften zu erhalten^[6,7]. Obgleich auch auf diesem Teilgebiet mit chemisch-biologischen Methoden beachtliche Erfolge zu verzeichnen waren, sind wir von einer zufriedenstellenden Manipulation der Zellfunktion, insbesondere bei höher differenzierten Organismen (Eukaryonten), doch noch weit entfernt.

In diesem Beitrag wird ein Verfahren vorgestellt, mit dem es generell möglich erscheint, Gene und membran-impermeable Substanzen durch Membranen von Prokaryonten und Eukaryonten zu schleusen. Es beruht darauf, daß die Zellmembranen, in denen elektrische Felder hoher Intensität (10^5 – 10^8 V/cm) natürlicherweise existieren, einem externen Feldpuls annähernd gleicher Intensität und kurzer Dauer ausgesetzt werden^[8]. Unter diesen Bedingungen bricht die Membran lokal elektrisch durch, so daß sie durchlässig wird.

Dieser Prozeß ist reversibel, d. h., die Membran regeneriert ihre ursprünglichen Eigenschaften in Zeiträumen, die experimentell kontrolliert werden können.

Das Verfahren des elektrischen Durchbruches wurde erfolgreich angewendet, um Pharmaka in Erythrocyten und Lymphocyten einzuschleusen^[9–12]. Derartig modifizierte Zellen können als Trägersysteme für den organ- und gewebe-spezifischen Transport von Pharmaka oder als Depotsysteme in der Blutbahn dienen, ohne daß es zu nennenswerten immunologischen Reaktionen kommt. Über ein derartiges Trägersystem (siehe auch ^[12a]) ist es möglich, eine optimale Konzentration des Pharmakons am Wirkungsort zu erzielen; gleichzeitig werden dadurch an anderen Orten im Organismus unerwünschte, toxische Nebenreaktionen vermieden, die infolge höherer Dosierung und mehrfacher Dosisapplikation auftreten könnten.

Die Technik des elektrischen Durchbruches läßt sich aber auch, wie in den beiden letzten Jahren gezeigt wurde, für Gentransfer und Genmanipulation in Eukaryonten nutzen. Die Verschmelzung (Fusion) von Zellen durch Anwendung eines elektrischen Feldes ermöglicht es darüber hinaus, die eingangs skizzierten, auf den ersten Blick sehr divergent erscheinenden Problemstellungen unter völlig neuen Perspektiven anzugehen^[13]. Sicherlich sind wir in vielen Teilgebieten noch von einer praktischen Anwendung entfernt. Dieser Beitrag soll helfen, die potentiellen Möglichkeiten dieser elektrischen Methode für Medizin (Therapeutik und Diagnostik), Gentechnologie, Zellbiologie und Pflanzenphysiologie (Agrarwirtschaft) aufzuzeigen. Im folgenden werden sowohl die Prozesse, die in biologischen und künstlichen Membranen durch externe elektrische Felder induziert werden, als auch die bisherigen Anwendungen von manipulierten Zellen erörtert.

2. Elektrischer Durchbruch von Membranen

Die heute allgemein akzeptierte Modellvorstellung über die biologische Membran ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Phospholipide sind als planare Doppelschicht angeordnet, in der mosaikartig und asymmetrisch periphere oder integrale Struktur- und Transportproteine eingebettet sind^[4,5,14]. Die laterale Fluidität der Phospholipide ist sehr hoch, während ihre Beweglichkeit senkrecht zur Membranfläche stark limitiert ist. Ein „Flip-Flop“ der Lipide in dieser Richtung ist deshalb ein sehr unwahrscheinliches Ereignis.

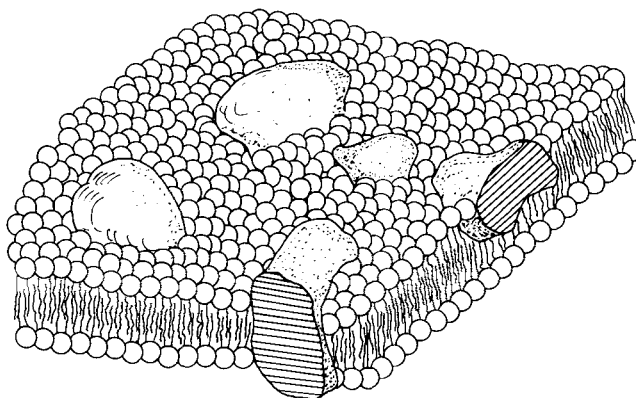


Abb. 1. Gegenwärtige Modellvorstellung über den strukturellen Aufbau einer Zellmembran (modifiziert nach [14]).

[*] Ausführliche Darstellung siehe Science 209, 1317–1438 (1980).

In einem elektrischen Ersatzschaltbild läßt sich die Membran durch einen Plattenkondensator mit der Kapazität C_m und einem dazu parallel geschalteten Widerstand R_m beschreiben (Abb. 2). Dabei fungieren die wäßrigen Außenlösungen und die polaren Köpfe der Lipide als Platten und das Membraninnere als Dielektrikum mit einer relativen Dielektrizitätskonstante von 2 bis 3. Der Widerstand des wäßrigen Außenmediums R_E liegt in Serie zur Membran. Der spezifische Widerstand von Zellmembranen hat die Größenordnung 10^2 bis $10^4 \Omega \text{ cm}^2$, der spezifische Widerstand von künstlichen Lipid-Doppelschichten liegt noch um drei bis vier Größenordnungen höher^[15,16]. Dagegen ist die spezifische Kapazität von künstlichen und biologischen Membranen mit 0.3 bis $0.7 \mu\text{F cm}^{-2}$ bzw. $1 \mu\text{F cm}^{-2}$ durchaus ähnlich^[17,18].

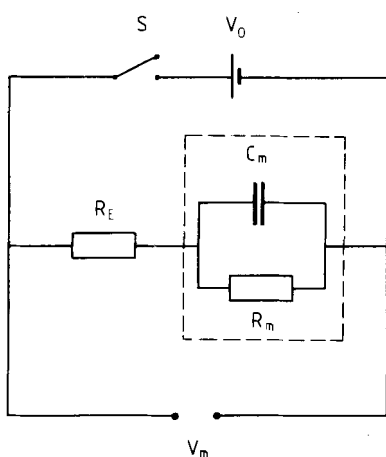


Abb. 2. Erläuterung der Ladungspulsmethode (schematisch) mit elektronischem Ersatzschaltbild einer biologischen oder künstlichen Membran. Die Membran kann als Plattenkondensator (spezifische Kapazität C_m) mit parallel geschaltetem Widerstand (spezifischer Widerstand R_m) dargestellt werden. Bei Ladungspulsexperimenten wird die Membrankapazität C_m für ns bis μs über einen Schalter S mit einer Spannungsquelle (V_0 zwischen 1 und 100 V) verbunden. Nach dem Puls wird der äußere Stromkreis hochohmig geschaltet. Die Ladung auf C_m kann deshalb nur durch Ladungstransport durch die Membran mit einer Zeitkonstante $\tau = R_m C_m$ ausgeglichen werden. Die zeitliche Auflösung beträgt etwa 50 ns (Einzelheiten siehe Text und [28]).

Kondensatoren können bekanntlich nur bis zu einer Höchstspannung aufgeladen werden. Oberhalb dieses kritischen Wertes, der von Plattenabstand und Dielektrikum abhängt, kommt es zu einem elektrischen Durchbruch (oder dielektrischen Durchbruch) des Kondensators. Der elektrische Durchbruch ist mit einer extremen Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit des Kondensators verbunden, die in der Regel irreversibel ist, d. h., der Kondensator wird zerstört. Bei „selbstheilenden“ Kondensatoren regenerieren sich dagegen die ursprünglichen Widerstands- und Kapazitätseigenschaften wieder. Biologische Membranen und künstliche Lipid-Doppelschichten verhalten sich unter bestimmten experimentellen Bedingungen beim elektrischen Durchbruch analog wie selbstheilende Kondensatoren in der Technik^[18,19]. Voraussetzung für einen reversiblen elektrischen Durchbruch bei Zellmembranen ist, daß die kritische Membranspannung innerhalb von ns bis μs erreicht wird. Der reversible elektrische Durchbruch wird bei Membranspannungswerten zwischen 0.5 und 2 V, je nach Temperatur und Ladezeit, beobachtet^[12,20]. Die Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit der Membran und damit der Permeabilität kann beträchtliche Werte annehmen. Membranen menschlicher Erythrocyten sind nach Feldapplikation für Proteine,

Desoxyribonucleinsäuren und sogar Latexteilchen (Durchmesser $0.2 \mu\text{m}$) passierbar^[21–23]. Bei relativ kurzen Polarisierungszeiten der Membran sind die elektrisch induzierten Struktur- und Permeabilitätsänderungen reversibel, wobei die Kinetik des Ausheilprozesses eine Funktion der Temperatur ist^[24]. Bei höheren Temperaturen (37°C) laufen die Regenerierungsprozesse innerhalb weniger Sekunden bis Minuten ab, während bei tieferen Temperaturen (4°C) noch nach vielen Minuten bis Stunden eine erhöhte Permeabilität der Membran beobachtet wird^[12]. Der Grad der Reversibilität des Membrandurchbruches hängt im wesentlichen von der Dauer des Feldpulses ab. Bei biologischen Membranen kommt es im allgemeinen zu irreversiblen Änderungen in der Zelle, wenn das Feld länger als 20 bis $100 \mu\text{s}$ anliegt. Bei überkritischen Feldpulsen, d. h. bei Pulsen, deren Intensität um einen Faktor 4–6 höher liegt als sie zum Erreichen der Durchbruchsspannung benötigt wird, können bereits bei kürzeren Applikationszeiten irreversible Störungen der Membran- und Zellfunktionen beobachtet werden^[12]. Zellen, deren Kernvolumen etwa 70 bis 80% des Gesamtvolumens beträgt (z. B. Lymphocyten), sind besonders empfindlich gegenüber längeren Applikationszeiten von Feldpulsen höherer Intensität. Bei künstlichen planaren Lipidmembranen wird eine irreversible mechanische Zerstörung der Membran bereits bei Pulsen von etwa $10 \mu\text{s}$ beobachtet^[25,26]. Das letztere Phänomen, das seit mehr als 20 Jahren für künstliche Lipidfilme bekannt war, wurde von Benz und Zimmermann (vgl. [27]) als mechanischer, irreversibler Durchbruch bezeichnet, um das elektrische und mechanische Verhalten in diesem Pulslängenbereich vom Phänomen des reversiblen elektrischen Durchbruches eindeutig abzugrenzen.

2.1. Künstliche Lipidmembranen

Ladungsexperimente an künstlichen Lipidfilmen haben in den letzten zwei Jahren erhebliche Einblicke in die Prozesse ermöglicht, die beim elektrischen und beim mechanischen Durchbruch ablaufen. Diese Untersuchungen, die im folgenden etwas eingehender diskutiert werden, haben die grundlegenden Voraussetzungen geschaffen, die sowohl zur Fusionierung von Zellen über Feldpulse als auch zur Einschleusung von normalerweise membran-impermeablen Substanzen in Zellen führten.

Das Ersatzschaltbild der verwendeten experimentellen Anordnung ist in Abbildung 2 wiedergegeben^[28]. Die Membran wird bei einem niederohmigen Außenkreis über eine Spannungsquelle mit einer hohen Ausgangsspannung V_0 in kurzer Zeit (ns bis μs) auf eine Spannung V_m aufgeladen. Nach dem Puls ist der Außenkreis hochohmig, und die auf der Membrankapazität befindliche Ladung (die dadurch induzierte Spannung V_m) kann nur durch Ladungstransport innerhalb der Membran ausgeglichen werden.

Aus der exponentiell abfallenden Spannung läßt sich die Relaxationszeit $\tau = R_m C_m$ der Membran bestimmen. Da die spezifische Kapazität von Lipidfilmen gemessen werden kann (s. o.), ist auf diesem Weg der Widerstand der Membran zu ermitteln. Die zeitliche Auflösung dieser Ladungspulsmethode beträgt 40–100 ns, wenn die planaren Lipidfilme auf beiden Seiten an eine 1 M KCl-Lösung grenzen^[27,28]. Abbildung 3 zeigt Ladungspulsexperimente an einer planaren Lipid-Doppelschicht aus oxidiertem Cholesterin/*n*-Decan. Durch einen Ladungspuls von etwa 500 ns Dauer wurde

diese Membran zunächst auf 100 mV aufgeladen (Relaxation 1). Bedingt durch den hohen spezifischen Widerstand einer unmodifizierten Lipid-Doppelschicht (10^7 – $10^8 \Omega \text{ cm}^2$) entlädt sich die Membran im Sekundenbereich. Im Anschluß hieran wurde die Membran auf 400 mV aufgeladen. Bei dieser Spannung tritt der mechanische Durchbruch der Membran auf, d. h., sie wird irreversibel zerstört. Die Membranspannung geht innerhalb von ca. 300–400 μs wegen eines sich aufweitenden Lochs (Anstieg der Leitfähigkeit) auf Null zurück (Relaxation 2). Eine Theorie für den Mechanismus des mechanischen Durchbruchs von Lipid-Doppelschichten, die auf der Fluktuation von Poren beruht, entwickelten Chizmadzhev et al.^[29]

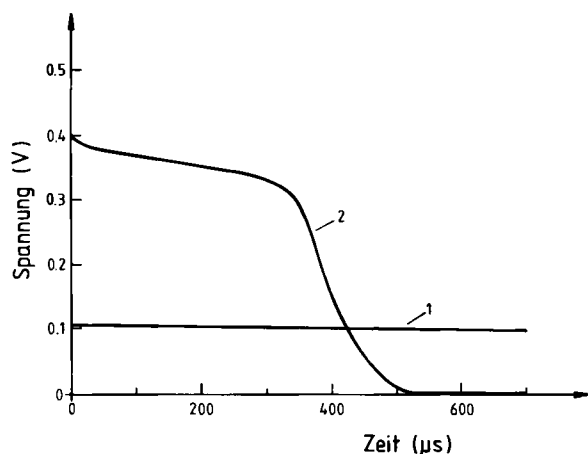


Abb. 3. Mechanischer Durchbruch von künstlichen planaren Lipidmembranen aus oxidiertem Cholesterin (gelöst in *n*-Decan). Im ersten Ladungspulsexperiment (1) wurde die Membran auf 100 mV aufgeladen (Puls nicht gezeigt; Pulsdauer 500 ns). $R \cdot C$ ist hoch, d. h. die Membran entlädt sich sehr langsam (nahezu parallel zur Zeitachse). Im zweiten Experiment (2) wurde die Membran mit einem Ladungspuls höherer Amplitude auf 400 mV aufgeladen. Nach etwa 300 bis 400 μs bricht die Spannung infolge eines irreversiblen mechanischen Durchbruchs auf Null zusammen [27]. Experimentelle Bedingungen: Lösung: 1 M KCl, Temperatur 17 °C.

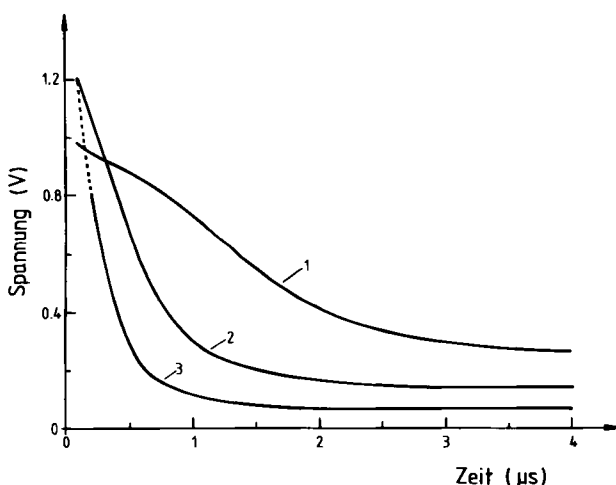


Abb. 4. Elektrischer (dielektrischer) Durchbruch einer künstlichen planaren Lipidmembran aus oxidiertem Cholesterin. Die Membran wurde mit einem Ladungspuls hoher Amplitude auf 900 mV bzw. ca. 1,2 V aufgeladen (Pulsdauer 500 ns) (Experiment 1 bzw. 2). Die schnelle Relaxation der Spannung nach dem Puls ist auf eine starke Abnahme im Membranwiderstand infolge eines reversiblen elektrischen Durchbruchs zurückzuführen. Die Spannung von etwa 1,2 V kann bei Erhöhung der Amplitude des Ladungspulses nicht überschritten werden (Experiment 3). Bei überkritischen Ladungspulsen erfolgt der elektrische Durchbruch bereits während der Aufladung, so daß die Anfangsspannung aufgrund der zeitlichen Auflösung zwischen Pulsapplikation und Spannungsmessung scheinbar niedriger ist. Die Restspannung über der Membran ist nach dem elektrischen Durchbruch in allen drei Fällen zu klein, um einen mechanischen, irreversiblen Durchbruch zu erzeugen. Experimentelle Bedingungen: Lösung 1 M KCl, Temperatur 17 °C.

Abbildung 4 zeigt Ladungspulsexperimente an einer künstlichen Lipidmembran, bei denen die Membran auf weitaus höhere Spannungen innerhalb von 500 ns aufgeladen wurde. Im ersten Experiment (Relaxation 1) wurde die Membran auf ca. 900 mV aufgeladen. Im Anschluß an die Aufladung kommt es zu einer sehr schnellen Entladung, die auf einen elektrischen (dielektrischen) Durchbruch der Membran zurückzuführen ist. Da der elektrische Durchbruch reversibel ist, bleibt die Membran mechanisch stabil, so daß sie erneut aufgeladen werden kann. Im zweiten Experiment (Relaxation 2) wurde die Membran auf etwa 1,2 V aufgeladen. Die Membranspannung relaxiert wesentlich schneller als im Experiment 1. Die schnelle Entladung der Membran infolge des elektrischen Durchbruchs ist auf eine transiente Widerstandsänderung der Membran zurückzuführen, die acht Größenordnungen betragen kann (von 10^7 – $10^8 \Omega \text{ cm}^2$ auf $0,1 \Omega \text{ cm}^2$).

Wegen des Zusammenbruchs des Membranwiderstandes kann der Spannungswert von etwa 1 V nicht überschritten werden, auch wenn die Amplitude des Ladungspulses um ein Vielfaches erhöht wird^[25–27]. Bei überkritischen Ladungspulsen kommt es vielmehr bereits zu einem elektrischen Durchbruch während der Aufladung, so daß die Anfangsspannung aufgrund der hohen Leitfähigkeit der Membran zurückgeht (Relaxation 3). Durch Extrapolation der Entladungskurve auf das Ende des Ladungspulses läßt sich aus diesen und ähnlichen Versuchen abschätzen, daß der Durchbruch innerhalb von 10 ns erfolgt. Da der Durchbruch ein sehr schnelles Ereignis ist, kommt es bei längeren Ladungszeiten zu einem Stromfluß durch die Membran, der zu Sekundärreaktionen führen kann. Diese Beobachtung ermöglicht zugleich eine Erklärung für den weiter oben genannten Befund, daß der elektrische Durchbruch bei längeren Pulsapplikationen oder hoher Feldintensität zunehmend zu irreversiblen Änderungen in Zelle und Membran führt. Untersuchungen an der künstlichen Lipid-Doppelschicht haben gezeigt, daß die Ströme, die durch die Membran fließen, beträchtliche Werte annehmen können^[27].

Der elektrische Durchbruch der Membran kann durch lokale elektromechanische Kompression der Membran erklärt werden. Theoretisch läßt sich zeigen^[25–27], daß die Membran lokal oberhalb einer bestimmten Kompression instabil wird und durchbricht, möglicherweise unter Bildung von Elektrolyt-gefüllten Poren. Diese Vorstellung über den elektrischen Durchbruch in Lipidmembranen wird durch umfangreiche Untersuchungen an Zellmembranen gestützt^[19,20,30]. Bei Zellmembranen können Druckgradienten über der Membran oder hydrostatischer Druck zu äquivalenten transienten Leitfähigkeitsphänomenen führen, wie sie bei Feldpulsapplikation beobachtet werden^[30–32].

Beim elektrischen Durchbruch entstehen etwa 10^7 Poren/ cm^2 . Der Porendurchmesser wurde zu 8 nm abgeschätzt^[33]. Beim mechanischen irreversiblen Durchbruch dagegen reißt der Film von einer Stelle aus.

Die Regenerierung von Lipidfilmen ist im Unterschied zu der von Lipid-Protein-Membranen ein sehr schneller Prozeß und läuft innerhalb von wenigen μs ab. Mit einer Doppelpulsmethode wurde das Ausheilen von Lipidmembranen im Anschluß an einen elektrischen Durchbruch eingehend untersucht^[33]. Simultan zum Ladungspuls, der den elektrischen Durchbruch auslöst, wird ein Spannungspuls niedriger Amplitude appliziert. Über Messung von Strom und Spannung

kann der zeitliche Verlauf, mit dem sich die elektrisch induzierten Poren wieder schließen, bestimmt werden (Abb. 5).

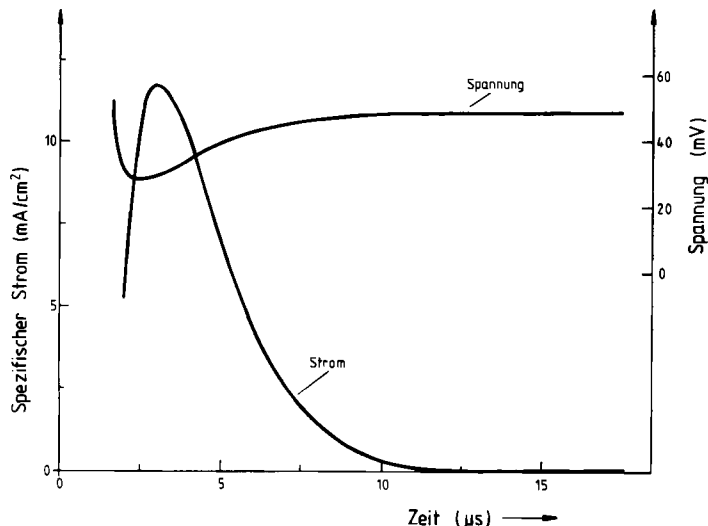


Abb. 5. Kinetik des Ausheilprozesses nach elektrischem Durchbruch einer künstlichen Lipidmembran aus oxidiertem Cholesterin. Mit einem Puls hoher Amplitude und einer Dauer von 500 ns wird elektrischer Durchbruch induziert (hoher Puls nicht gezeigt); gleichzeitig wird ein Spannungspuls mit einer kleinen Amplitude (48 mV) überlagert. Während des Ausheilprozesses^[34] steigt die Spannung auf 48 mV an; entsprechend nimmt der Strom ab. Experimentelle Bedingungen: Lösung: 1 M KCl, Temperatur 20 °C.

Die spezifische Leitfähigkeit (reziproker spezifischer Widerstand) fällt exponentiell ab (vgl. Abb. 6). Bei Raumtemperatur liegen die Zeitkonstanten des Ausheilprozesses in der Größenordnung von 2 µs, bei tieferen Temperaturen steigen sie auf 10 µs an^[33].

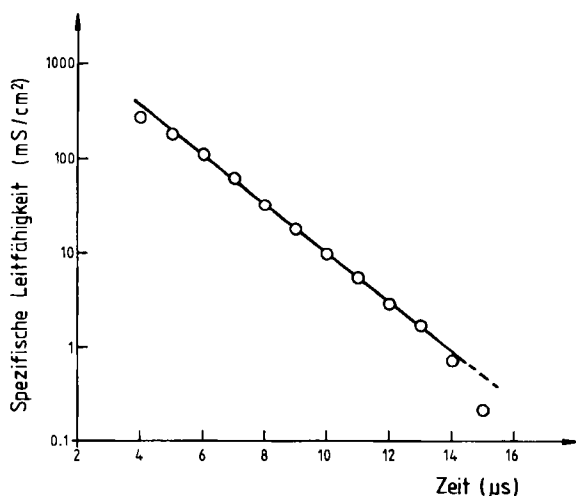


Abb. 6. Halblogarithmische Auftragung der Leitfähigkeit der Membran als Funktion der Zeit während des Ausheilprozesses. Die Strom- und Spannungswerte wurden Abb. 5 entnommen. Die Zeitkonstante beträgt etwa 2 µs, die Anfangsleitfähigkeit etwa 4 S cm⁻².

Unter bestimmten Annahmen können aus der zeitlichen Abnahme der Leitfähigkeit im Anschluß an den elektrischen Durchbruch die Diffusionskoeffizienten der Lipidmoleküle bei lateraler Bewegung in der Membran abgeschätzt werden. Die berechneten Werte (10⁻⁸ cm²/s) liegen im Bereich, der über optische Methoden ermittelt wurde^[33]. Die Zeitkonstanten des Ausheilprozesses von künstlichen Lipidfilmen

sind kleiner als sie normalerweise bei Zellmembranen gefunden wurden (s. bis min, s. o.)^[12]. Hieraus läßt sich schließen, daß die feldinduzierten Änderungen in den Proteinen wesentlich langsamer eliminiert werden. Enzymatische Prozesse scheinen zusätzlich bei der Regenerierung der Membran eine Rolle zu spielen.

Weiteren Aufschluß über den Mechanismus des elektrischen Durchbruchs und über die sich anschließenden Regenerierungsprozesse können aus Untersuchungen an vernetzten polymeren Phospholipidmembranen erwartet werden, wie sie Ringsdorf et al.^[34,35] durchgeführt haben. Durch die zahlreichen Variationsmöglichkeiten bei der Herstellung derartiger künstlicher Membransysteme eröffnet sich ein faszinierendes Forschungsgebiet für die Zukunft.

2.2. Zellmembranen

Bei Zellen, die groß genug sind, um Mikroelektroden einzuführen^[2], kann die Durchbruchspannung über die Messung der Strom-Spannungs-Charakteristik oder in Analogie zu den Experimenten an planaren Lipid-Doppelschichten mit der Ladungspulsmethode bestimmt werden. Umfangreiche Untersuchungen des elektrischen Durchbruchs liegen für große Algenzellen, Eier von *Fucus serratus* und neuerdings auch für das Riesenaxon des Tintenfisches vor^[36-39]. Meeresalgen wie *Valonia utricularis* und *Halicystis parvula*, deren Zelldurchmesser bis zu 1 cm groß sein können, zeigen wie planare Lipid-Doppelschichten eine Pulslängenabhängigkeit der Durchbruchspannung in einem bestimmten Pulslängenbereich (Abb. 7 und 8)^[26,38]. Interessant ist, daß der Bereich, in dem die Durchbruchspannung pulslängenabhängig ist, artspezifisch zu sein scheint – ein Befund, der für das Auffinden optimaler Bedingungen für die elektrisch induzierte Fusion und für das Einschleusen von impermeablen Substanzen in die Zelle von großer Bedeutung ist.

In pflanzlichen Zellen sind zwei Membranen, die Tonoplasten- und die Plasmalemmamembran, hintereinandergeschaltet (siehe Abb. 7). Die Tonoplastenmembran grenzt die

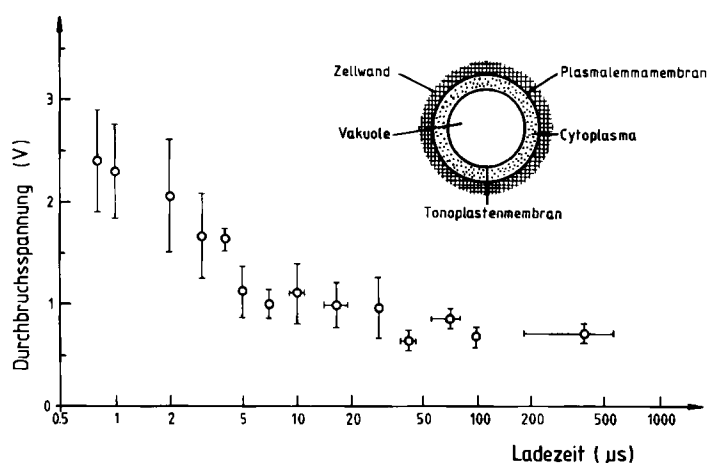


Abb. 7. Abhängigkeit der Membrandurchbruchspannung von der Ladezeit für eine Zelle der Riesenalge *Valonia utricularis* (mittlerer Durchmesser: 0,5 cm). Die Durchbruchspannung ist definiert als diejenige Spannung, die bei einer bestimmten Ladezeit (Pulslänge) nicht überschritten werden kann. Man beachte, daß die Pulslängenabhängigkeit der Durchbruchspannung anders als bei *Halicystis parvula* (Abb. 8a) im Bereich von 0,8–10 µs auftritt. – Der Ausschnitt zeigt den schematischen Aufbau einer Pflanzenzelle. Wenn man berücksichtigt, daß in Pflanzenzellen zwei Membranen hintereinandergeschaltet sind (Tonoplasten- und Plasmalemmamembran), ergeben sich für sehr kurze und sehr lange Ladezeiten die gleichen Werte für die Durchbruchspannung, wie sie für künstliche Lipidmembranen gemessen werden (Abb. 8b); Temperatur 18 °C [38].

Vakuole, ein salzhaltiges Kompartiment, vom Cytoplasma ab, während die Plasmalemmamembran, wie bei tierischen Zellen, das Cytoplasma zur Umgebung abschirmt. Pflanzliche Zellen sind außerdem durch eine Zellwand, die sich aus

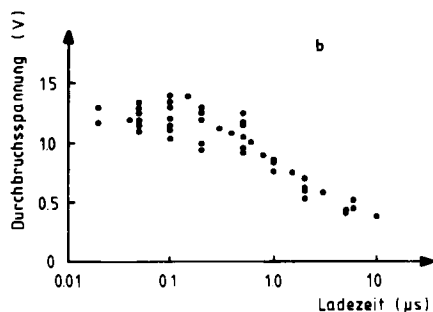
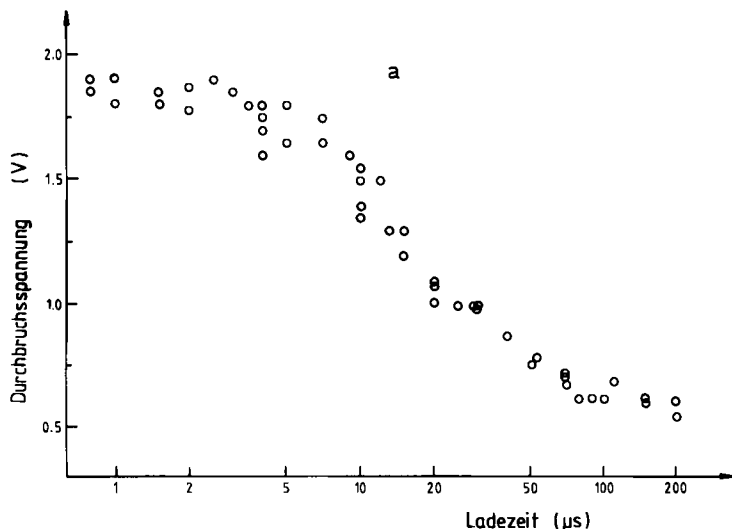


Abb. 8. Abhängigkeit der Membrandurchbruchsspannung von der Ladezeit a) für eine Zelle der Riesenalge *Halicystis parvula* (mittlerer Durchmesser: 0.5 cm) und b) für künstliche planare Lipidmembranen aus oxidiertem Cholesterin. Anders als bei der künstlichen Lipidmembran und bei *Valonia utricularis* tritt die Pulsweitenabhängigkeit der Durchbruchsspannung im Bereich von 5–100 µs auf. Temperatur 17 °C [25].

Cellulose, Pektin und Hemicellulosen zusammensetzt, stabilisiert. Deshalb kann sich über osmotische Prozesse ein erhöhter hydrostatischer Druck im stationären Zustand in der Zelle aufbauen. Die Differenz des hydrostatischen Drucks wird Turgor genannt; er kann Werte zwischen 1 und 40 bar annehmen^[2,30]. Geht man von der plausiblen Annahme aus, daß beide Membranen etwa die gleiche Durchbruchsspannung und etwa das gleiche RC-Verhalten aufweisen, so stimmen die Werte für die Durchbruchsspannung, die für sehr kleine oder für sehr große Pulsweiten gemessen wurden, sehr gut mit denen von künstlichen Lipidfilmen überein (Abb. 7 und 8).

Für kleine Zellen wie Erythrocyten, Lymphocyten, Bakterien und pflanzliche Zellen (Algen) müssen andere Nachweisverfahren für den elektrischen reversiblen Durchbruch herangezogen werden, da die Mikroelektroden nicht mehr

ohne irreversible Beschädigung der Membran in die Zelle eingeführt werden können. Bei kleinen Zellen wird entweder in eine Zellsuspension ein elektrischer Feldpuls geeigneter Intensität und Dauer appliziert oder sie werden durch ein lokal begrenztes elektrisches Feld bewegt. Infolge des externen elektrischen Feldes wird die Membran bis zu einer Spannung, V_m , polarisiert, die durch Gl. (1) gegeben ist^[40] (berechnet für den statischen Fall):

$$V_m = f \cdot a \cdot E \cdot \cos \theta \quad (1)$$

wobei a = Radius für sphärische Zellen (oder Halbachse parallel zur Feldrichtung für elliptische Zellen) und E = Feldstärke ist. θ gibt den Winkel zwischen der Normalen auf der Membran und der Feldrichtung an, was bedeutet, daß bei steigender Feldstärke die Durchbruchsspannung der Membran zuerst an den Polen (d. h. in Feldrichtung ($\cos 0^\circ = 1$)) erreicht wird; andere Membranbereiche brechen später durch. f ist der Formfaktor, der die von der geometrischen Form der Zelle abhängige Feldverzerrung berücksichtigt. Für sphärische Zellen ist $f = 1.5$, für einen unendlich langen Zylinder ist $f = 1$ ^[41].

Der Durchbruch der Membranen von suspendierten Zellen kann entweder über den Stoffaustausch durch die Membran nachgewiesen werden oder, weit empfindlicher, über Widerstandsmessungen in Partikelgrößenanalysatoren.

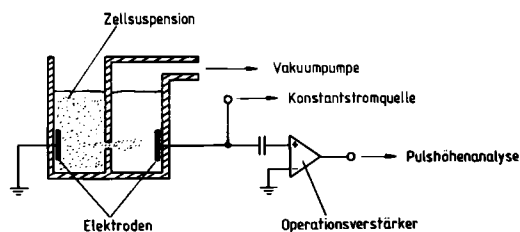


Abb. 9a. Schematische Darstellung eines Partikelvolumenanalysators (Einzelheiten siehe Text [8]).

Das Prinzip von Partikelanalysatoren ist aus Abbildung 9a ersichtlich^[42]. Zwei Kammern, die durch eine elektrisch isolierende Wand voneinander getrennt sind, sind mit Elektrolytlösung gefüllt. Eine kleine Öffnung in dieser Wand bildet eine leitende Verbindung zwischen den beiden Kammern. In jede Kammer ist jeweils eine Elektrode eingetaucht. Aufgrund der hohen Leitfähigkeit der Elektrolytlösung fällt die Spannung zwischen den Elektroden nahezu vollständig über der Meßöffnung ab. Die Feldstärke in der Meßöffnung liegt deshalb im Bereich von 10^3 bis 10^4 V/cm. Der Durchmesser der Meßöffnung muß der Größe der zu untersuchenden Zellen angepaßt sein. Er beträgt etwa 20 µm für Bakterien und 40–60 µm für menschliche Erythrocyten, Tumorzellen oder andere Zellen. Die Länge der Meßöffnung entspricht in der Regel dem Durchmesser. Durch Anlegen einer Druckdifferenz über die Meßöffnung werden Zellen, die in der Elektrolytlösung der einen Kammer suspendiert sind, durch die Meßöffnung gesaugt. Die nichtleitenden Zellen bewirken dabei eine Erhöhung des elektrischen Widerstandes der Meßöffnung, die als Strom- oder Spannungsänderung mit einem Operationsverstärker gemessen wird.

Das elektrische Feld in der Meßöffnung ist nicht über den gesamten Öffnungsquerschnitt homogen. Weiterhin können nicht-sphärische Zellen die Meßöffnung unter verschiedenen Orientierungen passieren. Deshalb hängt die Widerstandsän-

derung, die ein nichtleitendes Teilchen (z. B. eine Zelle, die von einer Membran mit hohem elektrischem Widerstand begrenzt wird) in der Meßöffnung hervorruft, nicht nur von seiner Größe ab, sondern auch von seiner Orientierung und vom Weg durch das elektrische Feld. Die Widerstandsänderung wird nach elektronischer Verstärkung mit einem Pulshöhenanalysator analysiert. Durch Kalibrierung mit Teilchen bekannten Durchmessers kann die Größenverteilung der durch die Meßöffnung gesaugten Zellen bestimmt werden. Zur Kalibrierung verwendet man gewöhnlich Latexteilchen, die eine scharfe Größenverteilung aufweisen und deren Durchmesser sehr genau bekannt ist.

Aufgrund der Inhomogenität des Feldes und der statistischen Orientierung beim Durchtritt durch die Meßöffnung zeigt die Größenverteilung von menschlichen Erythrocyten^[1] eine Rechtsschiefe^[43], obgleich aus anderen Untersuchungen (s. u.) bekannt ist, daß die Größenverteilung dieser Zellen normal ist. Derartige Partikelanalysatoren, wie sie herkömmlicherweise bis heute in Kliniken verwendet werden, sind für Untersuchungen des elektrischen Durchbruchs ungeeignet.

Die Inhomogenität und die statistische Orientierung von Zellen beim Durchtritt durch die Meßöffnung können vermieden werden, wenn die Zellen durch eine hydrodynamische Fokussierung in das Zentrum der Meßöffnung geleitet werden (Abb. 9b)^[8]. Die hydrodynamische Fokussierung der Zellen erreicht man durch eine Kapillare, deren Durchmesser dem der Meßöffnung entspricht und deren Spitze auf die Meßöffnung weist. Der Abstand der Kapillarspitze von der Meßöffnung liegt im Bereich des Meßöffnungsdurchmessers (siehe Abb. 9b).

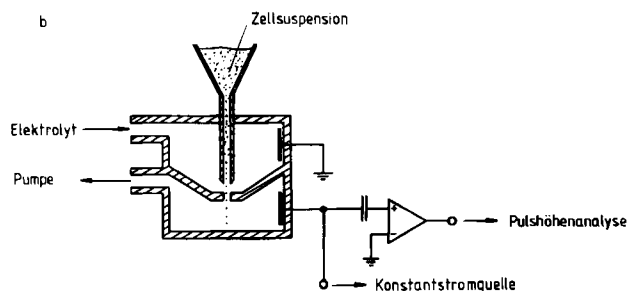


Abb. 9b. Schematische Darstellung eines Partikelvolumenanalysators mit hydrodynamischer Fokussierung der Zellen. Aufgrund der Fokussierung wandern die Zellen unter gleicher Orientierung zentral durch die Meßöffnung, so daß eine Volumenüberbewertung durch Randstörungen (inhomogenes Feld), wie sie bei der Anordnung in Abb. 9a auftreten kann (inhomogenes Feld), vermieden wird.

Durch die hydrodynamischen Kräfte in der Kapillarspitze (Bernoulli-Prinzip) werden die Zellen gezwungen, das inhomogene Feld auf dem gleichen Weg (d. h. längs der Zentralachse der Meßöffnung) zu passieren. Zugleich wird erreicht, daß nicht-sphärische Zellen oder durch hydrodynamische Kräfte verformte Zellen unter der gleichen Orientierung in die Meßöffnung eintreten, wobei die Längsachse der Teilchen parallel zur Zentralachse der Meßöffnung ausgerichtet ist. Der zellfreie Elektrolyt, der zusammen mit der Zellsuspension durch die Meßöffnung gesaugt wird, kühlt die Meßöffnung. Unter diesen Bedingungen beträgt die Temperaturerhöhung in der Kapillare weniger als 1 °C, so daß thermi-

sche Effekte auf die Zellmembran ausgeschlossen werden können. Das Spannungssignal, das die Zellen beim Passieren des Feldes induzieren, hängt nur von der Widerstandsänderung durch die Zelle und damit von deren Größe ab. Das Volumen der Zelle läßt sich deshalb sehr genau bestimmen, vorausgesetzt, daß die Verformung der Zelle unter den Strömungsbedingungen in der Meßöffnung und damit der Formfaktor auf optischem Wege bestimmt wurde^[45].

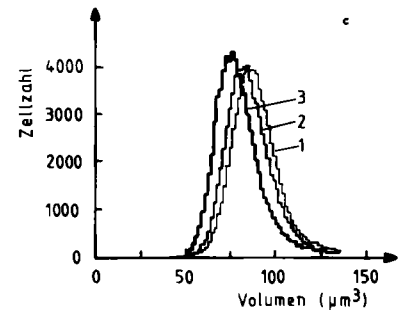


Abb. 9c. Volumenverteilungen von menschlichen Erythrocyten, die bei verschiedenen Feldstärken in der Meßöffnung gemessen wurden. Kurve 1 wurde bei unterkritischer Feldstärke (0.6 kV/cm) gemessen. Das mittlere Volumen beträgt 83 µm³, die Verteilung ist normal. Die Kurven 2 und 3 zeigen eine zunehmende Volumenunterbewertung mit steigender Feldstärke in der Meßöffnung (2.5 bzw. 3.5 kV/cm) infolge des elektrischen Durchbruchs der Erythrocytenmembran [19].

Abbildung 9c zeigt eine typische Volumenverteilung für menschliche Erythrocyten, die mit diesem Gerät gemessen wurde^[19]. Die Messung (Kurve 1) wurde bei einer mittleren Feldstärke von 0.6 kV/cm in der Meßöffnung durchgeführt. Die Verteilung (mittleres Volumen 83 µm³) ist normal. Bei Erhöhung der Feldstärke in der Meßöffnung (durch entsprechende Erhöhung der Spannung zwischen den beiden Elektroden) erhält man bis zu einem kritischen Wert der Feldstärke (etwa 2.1 kV/cm) eine Größenverteilung, die mit der bei niedrigerer Feldstärke gemessenen deckungsgleich ist (vorausgesetzt, daß die entsprechenden apparativen Bedingungen vorgegeben wurden)^[21].

Oberhalb der kritischen Feldstärke, die zum elektrischen Durchbruch der Zellmembran führt, kommt es dagegen zur Unterbewertung der Volumina und damit zur scheinbaren Verschiebung der Volumenverteilung zu kleineren Werten (Kurven 2 und 3). Die kritische Feldstärke, bei der die Unterbewertung auftritt, läßt sich im Regelfall nur dann exakt bestimmen, wenn die Größenverteilung bei niedriger Feldstärke keine Rechtsschiefe aufweist. Die scheinbare Unterbewertung des Volumens resultiert daraus, daß die Strom- (oder Feld-)linien teilweise durch das Zellinnere verlaufen, das wesentlich besser leitend ist als die intakte Zelle mit ihrer elektrisch isolierenden Membran. Dementsprechend ist die Widerstandsänderung der Zelle im Feld kleiner, und das Volumen der Zelle ist scheinbar verringert. Die Unterbewertung des Zellvolumens hängt zum einen von der Feldstärke (siehe Abb. 9c), zum anderen von der intrazellulären Leitfähigkeit ab (detaillierte Analyse siehe ^[40]). Für die intrazelluläre Leitfähigkeit müssen die Leitfähigkeit des Cytoplasmas sowie Zahl und Größe der Kompartimente (Organellen) in der Zelle berücksichtigt werden. Diese Kompartimente sind ebenfalls von einer isolierenden Membran umgeben. Aufgrund ihrer kleineren Dimensionen brechen die Membranen der Kompartimente erst bei wesentlich höherer Feldstärke durch [siehe Gl. (1)]. Im Prinzip besteht deshalb die Möglichkeit, die Feldstärke so hoch zu wählen, daß ein elektri-

[*] Menschliche Erythrocyten sind bikonkav und werden aufgrund der Strömungsverhältnisse in der Meßöffnung zu Ellipsoiden verformt [44].

scher Durchbruch auch in den Membranen von Organellen auftritt, so daß die Leitfähigkeit in diesen Kompartimenten und deren Membrandurchbruchsspannung separat bestimmt werden könnten. Aus der Änderung des Leitfähigkeitsspektrums lassen sich im allgemeinen weitreichende Schlüsse über die biochemische Aktivität der Zelle ziehen.

Das hier geschilderte Verfahren zur Bestimmung des Volumens, der Durchbruchsspannung und der inneren Leitfähigkeit von Zellen hat einige nicht unerhebliche Nachteile. Die Zahl der zu messenden Zellen muß relativ hoch sein (10^5 pro Verteilung). Die Messung der Verteilung in Abhängigkeit von der Feldstärke ist zeitraubend und aufwendig. Die Werte für die Durchbruchsspannung und die innere Leitfähigkeit können nicht individuellen Zellen zugeordnet werden. Deshalb ist es z. B. nicht möglich, Zellen mit veränderten Membraneigenschaften oder verändertem Stoffwechsel in Gegenwart einer großen Zahl von Zellen mit unveränderten Eigenschaften zu erfassen. Dies ist jedoch für eine breite diagnostische Anwendung in der Klinik notwendig.

Im Verfahren von Pilwat und Zimmermann (siehe z. B. [46–49]) werden diese Nachteile durch eine modifizierte Anordnung (Abb. 9d) behoben. Bei diesem neu entwickelten Partikelanalysator wird beim Eintritt des Teilchens in die Meßöffnung zunächst das Zellvolumen bestimmt. Während des Durchtritts durch die Meßöffnung wird das Teilchen längs der Zentralachse einem linear ansteigenden Feld ausgesetzt, dessen Feldstärke so hoch gewählt wird, daß etwa nach dem halben Weg durch die Meßöffnung der elektrische Durchbruch der Membran erreicht wird (Abb. 9d).

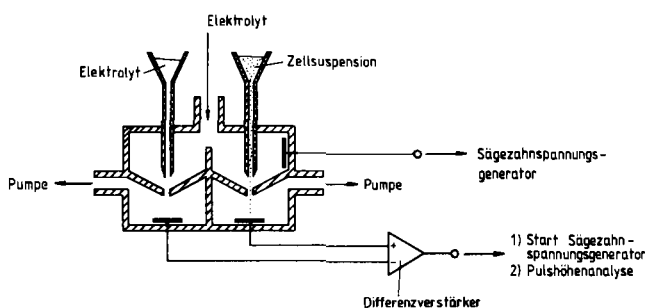


Abb. 9d. Multiparameter-Partikelanalysator für Durchbruchsexperimente an einzelnen Zellen. Jede einzelne Zelle wird während ihres Durchtritts durch die Meßöffnung zunächst einem konstanten und auf dem weiteren Weg einem linear ansteigenden Feld ausgesetzt. Der Anstieg der Feldstärke ist so gewählt, daß die Membran der Zelle auf halbem Wege durch die Meßöffnung elektrisch durchbricht. Dadurch können in einem Verfahrensschritt das Zellvolumen, die Durchbruchsspannung der Membran und die elektrische Leitfähigkeit des Zellinnern bestimmt werden. Der Anstieg der Feldstärke in der Meßöffnung induziert ein Störsignal, das dem Signal der Zelle überlagert ist. Mit einer Referenzöffnung und einem Differenzverstärker wird das Störsignal unterdrückt (Einzelheiten siehe [46–49]).

Der Feldanstieg wird durch Anlegen einer Sägezahnspannung in der Größenordnung von 10–40 V erzeugt. Das Signal der Zelle, das in der Größenordnung von 10–30 mV liegt, ist der Sägezahnspannung überlagert. Deshalb mußte ein Verfahren entwickelt werden, das es ermöglicht, dieses kleine Signal genau zu erfassen. Dies geschieht dadurch, daß parallel zur Meßöffnung, durch die die Zellen gesaugt werden, eine zweite, geometrisch annähernd gleiche Öffnung angeordnet ist. Durch diese Referenz-Meßöffnung wird nur zellfreier Elektrolyt gesaugt. Der zeitliche Verlauf des Feldes in der Referenz-Meßöffnung entspricht aber dem in der Meßöffnung. Durch Subtraktion der Spannungssignale beider Meßöffnungen in einem Differenzverstärker erhält man

das Spannungssignal des Teilchens; dieses Signal wird elektronisch verstärkt und analysiert. Da es technisch nicht möglich ist, Meßöffnungen mit exakt gleichen Dimensionen herzustellen, sind die elektrischen Ströme und die damit auftretenden Temperaturen (auch wenn sie sehr klein sind) in beiden Meßöffnungen nicht identisch. Durch eine Temperaturdifferenz von nur 0.01°C kann ein Spannungssignal induziert werden, das in der gleichen Größenordnung wie das von der Zelle induzierte Spannungssignal liegt. Dieses Problem läßt sich durch entsprechende elektronische Schaltungen und Versuchsbedingungen vollständig eliminieren (ausführliche Darstellung siehe [46, 47]).

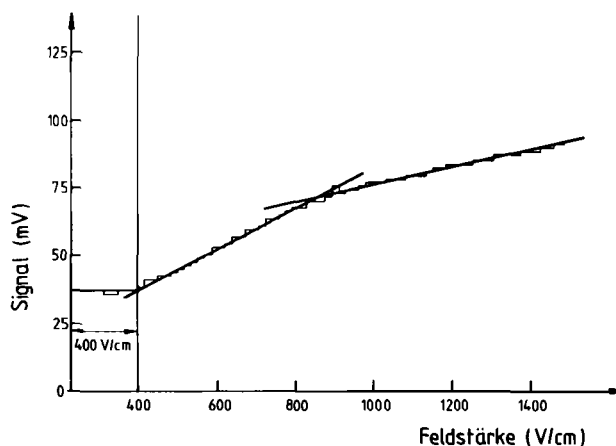


Abb. 10. Das Spannungssignal einer Friend-Zelle im elektrischen Feld des Multiparameteranalysators der Abb. 9d. Beim Eintritt in die Meßöffnung wird das Spannungssignal der Zelle zunächst bei konstanter äußerer Feldstärke (400 V/cm) bestimmt. In diesem Bereich ist das Signal der Zelle proportional zum Volumen. Beim weiteren Durchgang durch die Meßöffnung wird die Zelle einer linear ansteigenden Feldstärke ausgesetzt (siehe Abb. 9d). Entsprechend dem Ohmschen Gesetz nimmt das Signal der Zelle zunächst linear zu; der Membranwiderstand und damit der Widerstand der Zelle in diesem Feldbereich ändern sich nicht. Aus dem Anstieg läßt sich deshalb ebenfalls zur Kontrolle das Volumen der Zelle bestimmen. Oberhalb von etwa 850 V/cm wird die Membrandurchbruchsspannung erreicht. Da der Widerstand der Zelle abnimmt, nimmt das Signal der Zelle bei weiter steigender äußerer Feldstärke schwächer zu als vor dem elektrischen Durchbruch. Aus dem Verhältnis der Steigung vor und nach dem Membrandurchbruch kann auf die intrazelluläre Leitfähigkeit geschlossen werden [46–49].

Eine typische Messung ist für eine Friend-Zelle in Abbildung 10 dargestellt. Friend-Zellen sind Mäuseerythroblasten, die durch das Friend-Virus transformiert wurden^[50]. Diese Zellen bilden eine permanente Zelllinie, bei der z. B. durch Dimethylsulfoxid die Hämoglobinsynthese induziert werden kann. Der vordere Abschnitt in Abbildung 10 entspricht dem konstanten Feldbereich, in dem die Signalthöhe proportional zur Größe der Zelle ist. Mit zunehmender Feldstärke nimmt das Spannungssignal der Zelle linear zu (Ohmsches Gesetz), vorausgesetzt, der Widerstand der Zelle bleibt konstant, und steigt beim Erreichen des Membrandurchbruches mit einer schwächeren Steigung weiter an. Mit dem Verhältnis der Steigung vor und nach dem Durchbruch läßt sich die Unterbewertung und damit prinzipiell die Leitfähigkeit bestimmen.

In Abbildung 11 sind mehr als 500 Einzelmessungen, wie sie in Abbildung 10 beschrieben wurden, zusammengefaßt. Die Durchbruchsspannung variiert hiernach von 0.7 bis 1.25 V; der häufigste Wert beträgt etwa 0.8 V. Der Volumenbereich der untersuchten Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, lag zwischen 500 und $1500\ \mu\text{m}^3$. In der stationären Phase wird häufig (auch bei anderen per-

manent Zellen) ein zweites, wesentlich schwächeres Maximum in der Durchbruchsspannung beobachtet, im allgemeinen bei 1.1 V (siehe Abb. 11).

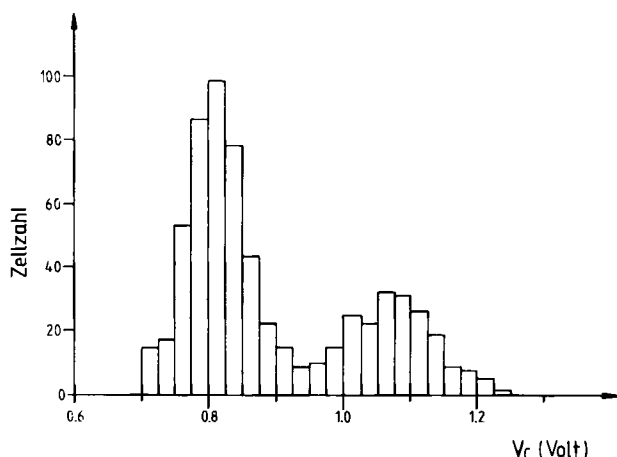


Abb. 11. Verteilung der Membrandurchbruchsspannung, V_c , in einer Population von Friend-Zellen. Die Höhe des zweiten Maximums kann mit den Kulturbedingungen stark variieren. Das Histogramm repräsentiert 518 Einzelmessungen, wie sie in Abb. 10 beschrieben wurden.

Die Unterbewertung der Zellen nach elektrischem Membrandurchbruch zeigt eine ähnliche Verteilung wie die Durchbruchsspannung. Das Hauptmaximum mit einer Durchbruchsspannung von 0.8 V ist mit einer Unterbewertung von 45% korreliert, das Nebenmaximum mit einer Unterbewertung von nur 30%.

Untersuchungen, wie sie in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt sind, geben Aufschluß über die Ausbeute bei der elektrisch induzierten Fusion von Zellen. Eine optimale Fusion unter Verwendung der Technik des elektrischen Durchbruchs (siehe Abschnitt 4) setzt eine möglichst scharfe Verteilung für die Durchbruchsspannung und das Volumen voraus. In diesem Fall wird praktisch eine Fusion aller im Feld befindlichen Zellen beobachtet. Andernfalls fusionieren nicht alle Zellen, da die Membranen nicht gleichzeitig auf die Durchbruchsspannung polarisiert werden. Eine homogene Verteilung für die Durchbruchsspannung der Population läßt sich dadurch erreichen, daß die Zellen zunächst in einer Entladungskammer einem Feldpuls ausgesetzt werden, dessen Intensität so hoch ist, daß etwa 20–40% der Zellen irreversibel geschädigt werden. Irreversible Membranschäden treten vor allem bei Zellen auf, deren Membran entweder eine niedrige Durchbruchsspannung aufweist oder deren Durchmesser sehr groß ist, so daß die Durchbruchsspannung schon bei sehr niedriger Feldstärke erreicht wird [siehe Gl. (1)]. Durch Zentrifugation lassen sich die Zellen, deren Membranen reversibel regeneriert sind, abtrennen. Es ist ebenfalls vorteilhaft, größere Zellen vor Applikation des Feldpulses durch Filtration der Suspension zu entfernen.

Die Entladungskammer^[19,51] ermöglicht zugleich die experimentelle Untersuchung des Stoffaustausches durch die Zellmembran, der durch den elektrischen Durchbruch ausgelöst wurde, und das Einschleusen von normalerweise membran-impermeablen Substanzen in die Zellen.

3. Elektrische Permeabilisierung der Zellmembran

Der schematische Aufbau der Entladungskammer ist aus Abbildung 12 zu entnehmen. Zwei Elektroden, die mit ei-

nem Hochspannungskondensator über einen Hochspannungsschalter miteinander verbunden sind, sind in eine Zellsuspension eingetaucht. Der Kondensator wird über eine Hochspannungsquelle bis zum gewünschten Spannungswert aufgeladen. Die Entladung erfolgt exponentiell, und die Länge des applizierten Feldpulses läßt sich deshalb durch die RC -Zeit charakterisieren, d. h., durch den Widerstand der Lösung und die Kapazität des Kondensators. Da der Widerstand der Lösung im Regelfall nur in geringen Grenzen variiert werden kann, muß die Pulslänge über die Änderung der Kapazität des Kondensators verändert werden. Pulslängen zwischen 200 ns und 100 μ s, wie sie für Untersuchungen des reversiblen elektrischen Durchbruchs adäquat sind, können auf diesem Wege eingestellt werden.

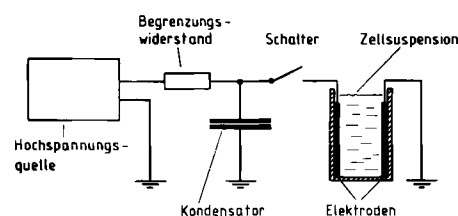


Abb. 12. Schematischer Versuchsaufbau der Pulsapparatur und Entladungskammer. Der Kondensator wird über einen Begrenzungswiderstand mit einer Hochspannungsquelle auf den gewünschten Spannungswert aufgeladen. Durch Schließen des Schalters wird der Kondensator über zwei Platinelektroden in die Zellsuspension entladen.

Abbildung 13 zeigt Ergebnisse von Versuchen, bei denen Friend-Zellen (suspendiert in phosphatgepufferter Elektrolytlösung) zunächst bei 4 °C Feldpulsen verschiedener Intensität und Dauer ausgesetzt wurden. Nach der Feldapplikation wurden die Zellen in Nährmedium übertragen, und das Wachstum wurde bei 37 °C verfolgt. Wie Abbildung 13 zu

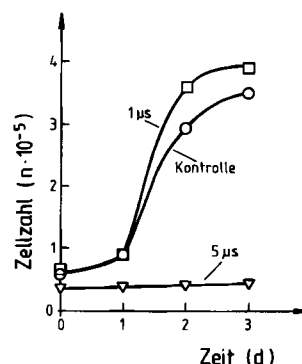


Abb. 13. Wachstum von Friend-Zellen nach Pulsapplikation mit der Entladungskammer (Abb. 12). Die Feldstärke betrug 10 kV/cm. Bis zu einer Pulslänge von 1 μ s wird kein Einfluß auf das Wachstum beobachtet; oberhalb einer Pulslänge von 5 μ s findet bei vorgegebener Feldstärke kein Wachstum mehr statt. Weitere Erläuterungen siehe Text (G. Pilwat, U. Rdest, W. Goebel, U. Zimmermann, unveröffentlichte Ergebnisse).

entnehmen ist, sind keine Unterschiede im Wachstum der feldexponierten Zellen und der Kontrollzellen zu beobachten, wenn die Pulslänge nicht größer als 1 μ s ist und die Feldstärke einen Wert von etwa 10 kV/cm nicht überschreitet. Bei größeren Pulslängen oder höherer Feldintensität kommt es dagegen zu einer teilweisen irreversiblen Zerstörung von Zellen (s. o.) und demzufolge zu vermindertem Wachstum.

Zellen ohne Zellkern, z. B. menschliche Erythrocyten, sind wesentlich unempfindlicher gegen hohe Feldstärken und längere Applikation. Bei diesen Zellen können Feldstärken von 12 kV/cm und Pulslängen von 40 μ s verwendet werden, ohne daß eine Beeinträchtigung des Regenerierungsprozesses der Membran bei 37 °C beobachtet wird^[12].

Bei einer Pulslänge von 40 μ s und einer Feldstärke von 2 kV/cm beobachtet man einen reversiblen K^+/Na^+ -Austausch zwischen Erythrocyten und Medium. Diese Feldstärke entspricht einer Spannung von 1 V über der Erythrocytenmembran, so daß die Schlußfolgerung erlaubt ist, daß der reversible elektrische Durchbruch mit einem erhöhten Ionentransport durch die Membran verbunden ist. Bei höherer Feldstärke beobachtet man beginnende Hämolyse der Erythrocyten. Die Hämolysegeschwindigkeit, d. h., die Geschwindigkeit, mit der Hämoglobin aus den Zellen austritt, hängt nicht nur von Feldstärke und Dauer des Feldpulses ab, sondern auch von der Zusammensetzung der isotonen Außenlösung. In isotoner Elektrolytlösung setzt die Hämolyse bei einer Feldstärke von 3–4 kV/cm (Pulslänge 40 μ s) ein. Die Hämolysekinetik folgt in erster Näherung einer exponentiellen Funktion (Reaktion 1. Ordnung), deren Zeitkonstante bei 1 min liegt. In isotonen Lösungen, die steigende Konzentrationen von Saccharose enthalten, wird die Hämolyse entsprechend verlangsamt. Bei einer Konzentration von 40 mM Saccharose beträgt z. B. die Zeitkonstante etwa 2–3 h (siehe Abb. 14). Über Modellbetrachtungen^[51a] unter Verwendung der phänomenologischen Gleichungen der Thermodynamik irreversibler Prozesse^[52] lassen sich aus diesen Versuchen Rückschlüsse auf den Durchmesser der Poren ziehen.

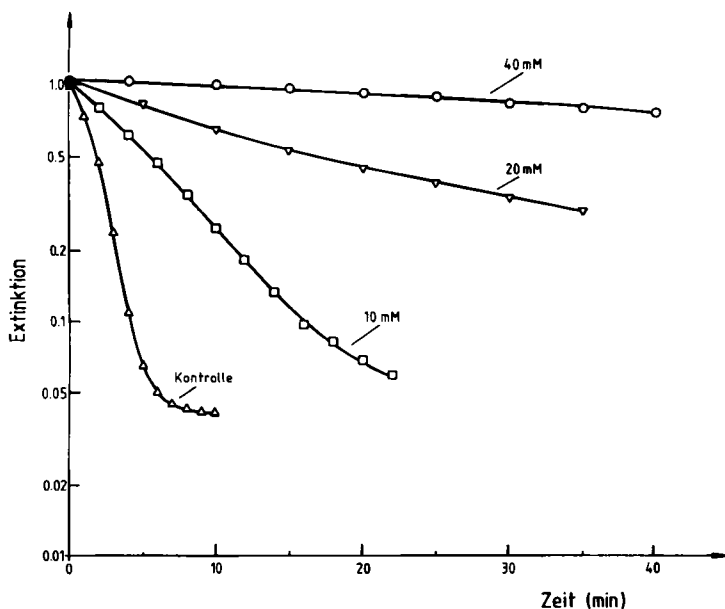


Abb. 14. Hämolyse von menschlichen Erythrocyten nach Feldpulsapplikation (Feldstärke 8 kV/cm, Pulslänge 40 μ s) in isotonen Lösungen, die unterschiedliche Saccharosemengen enthielten. Nach der Pulsapplikation in der Entladungskammer bei 4 °C wurde die Hämolysegeschwindigkeit durch Abnahme der intakten Zellen mit einem Photometer über Messung der Extinktion bei 700 nm verfolgt. Die Hämolyse verläuft nach der 1. Ordnung und wird durch steigende Saccharosekonzentration zunehmend verlangsamt.

Die Modellbetrachtungen beruhen auf der Annahme, daß sich osmotische Prozesse den elektrisch induzierten Permeabilitätsänderungen in der Zellmembran anschließen. In der

intakten Erythrocytenmembran liegt unter stationären Bedingungen ein in die Zelle gerichteter Konzentrationsgradient für Natrium-Ionen vor (20 mM intrazellulär, 85 mM extrazellulär), während der Konzentrationsgradient für Kalium-Ionen auswärts gerichtet ist (95 mM bzw. 40 mM). Die intakte Membran zeigt eine gewisse Permeabilität für Kalium- und Natrium-Ionen, d. h., daß ein passiver Transport (entsprechend den Differenzen im elektrochemischen Potential dieser Ionen) beobachtet wird. Die passiven Transportvorgänge werden durch aktive (stoffwechselabhängige), entgegengesetzt gerichtete Transportprozesse kompensiert. Für das Haupt-Anion, das Chlorid-Ion, liegt eine Donnan-Verteilung vor, da die Membran für Chlorid-Ionen durchlässig ist^[53]. Die intakte Membran ist für Saccharose undurchlässig. Im stationären Zustand läßt sich demnach die osmotische Bilanz durch Gleichung (2a) und (2b) wiedergeben:

$$\sigma_{Hb} \pi_{Hb} + \sigma_{KCl} \Delta \pi_{KCl} + \sigma_{NaCl} \Delta \pi_{NaCl} = 0 \quad (2a)$$

für isotone Elektrolytlösung und

$$\sigma_{Hb} \pi_{Hb} + \sigma_{KCl} \Delta \pi_{KCl} + \sigma_{NaCl} \Delta \pi_{NaCl} + \sigma_{Sa} \pi_{Sa} = 0 \quad (2b)$$

für isotone Elektrolytlösung mit Saccharose.

Dabei ist $\Delta \pi$ die Differenz des osmotischen Drucks für Kalium- und Natrium-Ionen, π_{Hb} und π_{Sa} der osmotische Druck des Hämoglobins bzw. der Saccharose. σ , der Reflektionskoeffizient, ist ein Maß für die Permeabilität einer Substanz^[52]. $\sigma = 1$ bedeutet, daß die Membran für den betreffenden Stoff (Ion) undurchlässig ist. Wird (oder ist) sie dagegen durchlässig, so nimmt der Reflektionskoeffizient ab und entsprechend der effektive osmotische Druck, $\sigma \pi$, der von der Substanz auf die Membran ausgeübt wird. $\sigma = 0$ bedeutet, daß die Membran vollständig durchlässig geworden ist, so daß die Substanz zum osmotischen Druck nicht mehr beiträgt^[52]. σ ist eine Funktion der Feldstärke und Pulslänge^[24], d. h., eine Funktion der feldinduzierten Permeabilitätsänderung in der Membran. Die Abnahme von σ mit steigender Permeabilität der Membran hängt von der Größe und von der Ladung der betreffenden Substanz ab. Für einwertige Ionen (wie z. B. Kalium- und Natrium-Ionen) geht σ bereits bei einer elektrischen Feldstärke^[24], die gerade hoch genug ist, um den elektrischen Durchbruch in der Membran auszulösen, gegen Null, während für zweiwertige Ionen (z. B. Sulfat, Hydrogenphosphat etc.) und für Nichtelektrolyte mit großem Durchmesser (Saccharose, 0.4 nm, Inulin, 1.2 nm und Hämoglobin, 3.0 nm Moleküldurchmesser)^[54] wesentlich größere Permeabilitätsänderungen induziert werden müssen, damit die Reflektionskoeffizienten meßbar abnehmen.

Durch den elektrischen Durchbruch wird die Permeabilität der Membran signifikant erhöht. Ihre Fähigkeit, zwischen Natrium- und Kalium-Ionen zu diskriminieren, geht verloren, und sie wird permeabel für Saccharose. Die Äquilibrierung der Kalium- und Natrium-Ionen zwischen Zelle und Umgebung (Einstellung des Donnan-Gleichgewichtes) erfolgt deshalb sehr rasch. Der osmotische Druck des Hämoglobins kann deshalb nach Gleichung (2a) nicht mehr kompensiert werden, und die Zellen hämolysieren innerhalb kürzester Zeit. In Gegenwart von Saccharose ist die Hämolyse verlangsamt, da Saccharose aufgrund des größeren Molekül-

durchmessers und des entsprechend höheren Reflektionskoeffizienten wesentlich langsamer in die Zelle diffundiert, d. h., daß der Zeitpunkt der Hämolyse nach Gleichung (2b) wesentlich später erreicht wird. Da die Hämoglobinmenge pro Zelle altersunabhängig ist, das Volumen aber mit steigendem Alter abnimmt, liegen in einer Erythrocytenpopulation Zellen mit unterschiedlichem osmotischem Druck des Hämoglobins vor^[55]. Hierauf ist es zurückzuführen, daß der hämolytische Zeitpunkt nicht für alle Zellen gleichzeitig erreicht wird, so daß die Gesamtpopulation über ein längeres Zeitintervall hämolysiert (siehe Abb. 14).

Diese Überlegungen können im Prinzip auf andere Nicht-elektrolyte oder Elektrolyte in der Außenlösung übertragen werden.

Aus der verzögerten Hämolyse in Abhängigkeit vom Moleküldurchmesser der dem Außenmedium zugesetzten Substanz kann demnach auf den Radius der elektrisch induzierten Pore geschlossen werden^[51a]. Unter diesen Voraussetzungen kann er auf etwa 3 nm geschätzt werden – ein Wert, der sehr gut mit dem an künstlichen Lipidmembranen ermittelten übereinstimmt (s. o.).

Bei tiefen Temperaturen bleibt die erhöhte Permeabilität der Zellmembran für längere Zeit bestehen, so daß eine Äquilibration auch für Makromoleküle möglich ist, vorausgesetzt, daß Feldstärke und Pulsdauer adäquat eingestellt wurden. Bei Erhöhung der Temperatur auf 37 °C regenerieren die ursprünglichen Eigenschaften der Erythrocytenmembran vollständig, einschließlich der aktiven Transportprozesse. Oberhalb von 16 kV/cm (bei Pulslängen von 40 µs) treten dagegen verstärkt irreversible Veränderungen in der Membran auf, die unter bestimmten Versuchsbedingungen (z. B. isotone Saccharose-Lösungen) schon bei wesentlich niedrigeren Feldstärken beobachtet werden können^[56]. Der Hämoglobingehalt der entstandenen Schatten-(Ghost-)Zellen kann, wie weiter oben beschrieben, über Variation von Feldstärke und Pulslängen in Kombination mit der Zusammensetzung des Mediums adäquat für den jeweiligen Verwendungszweck eingestellt werden^[12, 20, 21, 49].

Das beschriebene Verfahren läßt sich für die Einschleusung von membran-impermeablen Substanzen auch für andere Zellen nutzen, da die Feldapplikation in isotonen Lösungen durchgeführt wird. Ein Beispiel für Mäuselymphocyten ist in Abbildung 15 wiedergegeben^[12]. Als Indikator für die elektrisch induzierte Aufnahme durch die Membran wurde Eosin verwendet. Dieser Farbstoff wird im Cytoplasma irreversibel gebunden und kann die intakte Membran nicht passieren. Eosin wurde bei 4 °C vor der Feldapplikation der Außenlösung zugesetzt und die Pulslänge auf 500 ns reduziert, da das Kernvolumen von Lymphocyten bei 70% des Gesamtvolumens liegt, so daß bei diesen Zellen nach dem Durchbruch irreversible Sekundärreaktionen in der Membran, im Cytoplasma und insbesondere im Kern auftreten können (s. o.). Abbildung 15 zeigt, daß mit steigender Feldstärke die Zahl der Lymphocyten, die Eosin aufnehmen, stetig zunimmt. Die Reaktion ist reversibel. Dies läßt sich dadurch nachweisen, daß Eosin erst nach dem Regenerierungsprozeß der Membran bei 37 °C zugesetzt wird. Bis zu Feldstärken von 16 kV/cm nehmen die feldexponierten und regenerierten Zellen unter diesen Bedingungen keinen Farbstoff auf. Aus diesen Untersuchungen konnte gefolgert werden, daß die Regenerierung der Membraneigenschaften bereits nach etwa 3 min für alle Zellen abgeschlossen ist^[12].

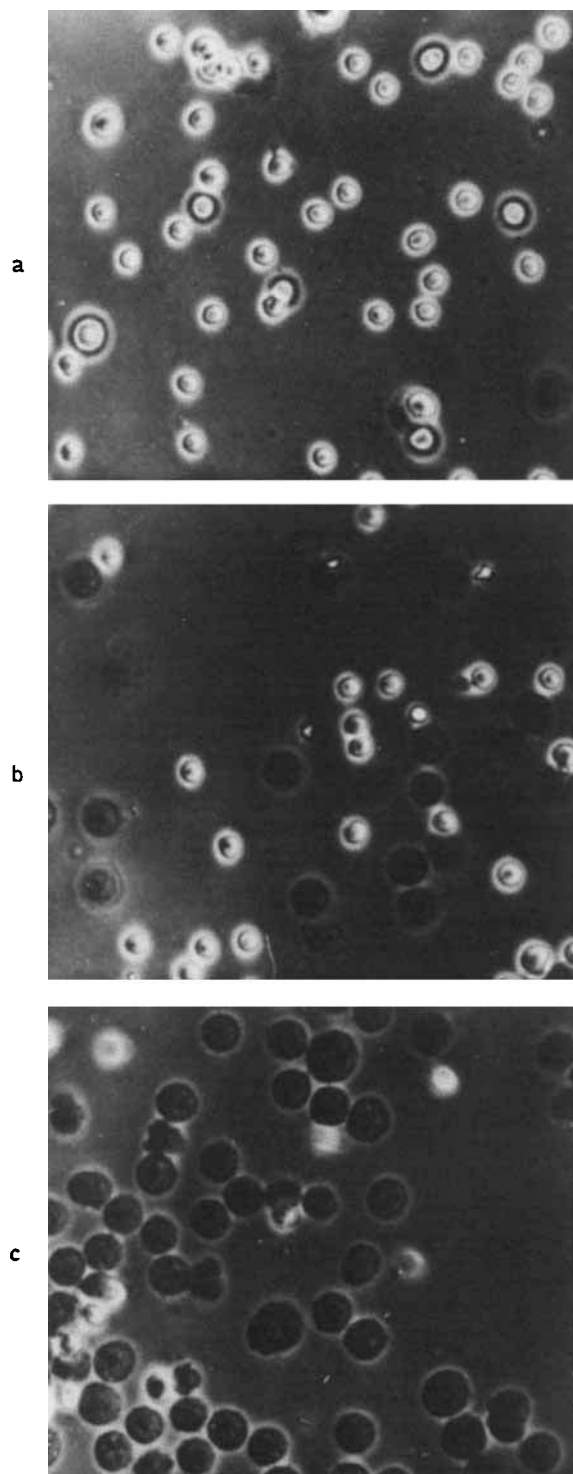


Abb. 15. Einschleusung von Eosin in Mäuselymphocyten nach Applikation von elektrischen Feldpulsen (a, b bzw. c: 6, 12 bzw. 18 kV/cm, Pulsdauer 0.5 µs) bei 4 °C. Der Farbstoff wurde der isotonen Lösung vor Pulsapplikation zugesetzt. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen, daß die Zahl der Lymphocyten, die Eosin aufnehmen, mit steigender Feldstärke stetig zunimmt [12].

4. Elektrisch induzierte Fusion

Der reversible elektrische Durchbruch der Zellmembran führt zu einer Störung in der Membranstruktur, so daß ein Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung möglich wird. Im folgenden betrachten wir zwei aneinanderhaftende Zellen, die mit ihrer Längsachse in Feldrichtung orientiert sind (Abb. 16). In diesem Falle findet der elektrische Durchbruch

an den Polen und in der Kontaktzone der beiden Zellen statt. Unter diesen Bedingungen ist, wie schematisch skizziert, sowohl ein Stoffaustausch der Zellen mit ihrer Umgebung als auch ein *interzellulärer* Massetransport möglich. Ist

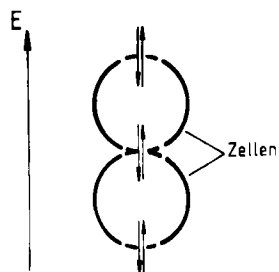


Abb. 16. Schematische Darstellung des elektrischen Durchbruches an zwei Zellen, die in Richtung des elektrischen Feldes aneinandergelagert sind. Der elektrische Durchbruch findet in den Membranbereichen in der Kontaktzone, die senkrecht zu den Feldlinien angeordnet sind, statt [siehe Pfeile und Gl. (1)]. Unter den gezeigten Bedingungen induziert der elektrische Durchbruch nicht nur einen Stoffaustausch zwischen den Zellen und dem Medium, sondern auch einen interzellulären Stoffaustausch.

der Membrankontakt eng genug (1–2 nm Abstand etwa), besteht darüber hinaus die Möglichkeit, daß Lipidmoleküle (und vielleicht auch Proteinmoleküle) aus der einen Membran in die andere diffundieren (Abb. 17). Während des Ausheilprozesses können sich demnach Lipidbrücken zwischen den Membranen beider Zellen ausbilden, d. h. mit anderen Worten, daß in der Kontaktzone beide Membranen nicht mehr separat voneinander ausheilen. Die so entstandenen Brücken (Abb. 17c) führen zu sehr kleinen Krümmungsradien und damit verbunden zu erhöhten Oberflächenspannungen. Der nächste Schritt, die Fusion der Zellen unter Bildung einer Kugel, ist deshalb energetisch begünstigt.

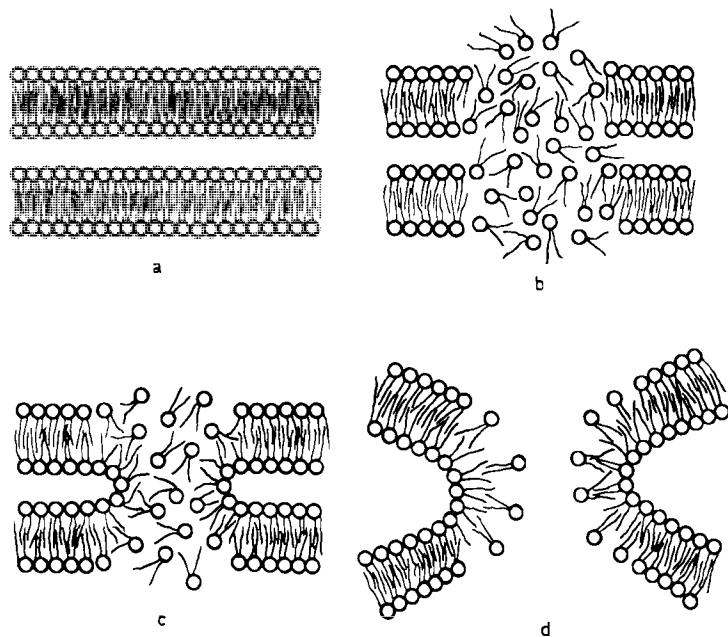


Abb. 17. Modellvorstellung über die molekularen Prozesse, die bei der elektrisch induzierten Fusion ablaufen. Die Lipid-Doppelschichten beider Membranen stehen in engem Kontakt senkrecht zu den Feldlinien (a). Dabei wird angenommen, daß sich zunächst durch laterale Diffusion der Proteine proteinfreie Bereiche gebildet haben. Der elektrische Durchbruch stört die Membranstruktur (b); durch Neuordnung der Lipidmoleküle können sich Brücken zwischen den Lipid-Doppelschichten beider Membranen bilden (c). Der Krümmungsradius der so gebildeten Poren ist sehr klein, so daß die Abrundung des „Zwei-Zellen-Aggregates“ zu einer einzigen Kugel energetisch begünstigt ist (d).

Diese qualitativen Überlegungen zeigen, daß prinzipiell der elektrische Durchbruch von Zellmembranen zur Fusion von Zellen führen kann, vorausgesetzt, daß zwei Zellen bei richtiger geometrischer Orientierung zum Feld hin sich mit ihren Membranen berühren.

In der Tat wurde bereits sehr früh beobachtet, daß bei Applikation von Feldpulsen durch Entladung eines Hochspannungskondensators in eine Zellsuspension mit hoher Dichte fusionierte Zellen entstanden^[57]. Die Ausbeute war allerdings sehr gering, da die notwendige Bildung von Zweieraggregaten normalerweise ein recht unwahrscheinlicher Vorgang ist. Brownsche Bewegung sowie die negative Oberflächenladung der Zellmembranen und die damit verbundenen Abstoßungskräfte verhindern den erforderlichen Membrankontakt. Dies ist auch der Grund, weshalb Zellen unter natürlichen Bedingungen in der Regel nur eine geringe Neigung zur spontanen Fusion aufweisen. Die bisher bekannten Fusionsverfahren erfordern „fusogen“ wirkende Substanzen oder entsprechend wirkende inaktivierte Viren^[6, 7, 58, 59]. Fusogen wirkende Substanzen oder Viren führen zur „Vernetzung“ der Zellen und stören gleichzeitig die Membranstruktur, so daß eine Fusion ausgelöst wird. In der Regel müssen allerdings unphysiologisch hohe oder auch niedrige pH-Werte in der Suspension vorgegeben oder hohe Calcium-Konzentrationen angewendet werden, um eine ausreichend große Störung in den Membranen zu induzieren^[6, 7, 58, 59]. Die bekannteste und wirksamste fusogene Substanz ist Polyethylenglycol (Molekulargewicht etwa 6000). Es ist mit großem Erfolg für die Fusion von Protoplasten benutzt worden. Für die Fusion von Säugetierzellen haben sich dagegen Sendai-Viren besonders bewährt, die stark agglutinierend wirken. Sie werden vor der Verwendung durch UV-Strahlung inaktiviert, so daß ihre Wirkung nicht an eine Infektion der Zelle gebunden ist^[6, 7]. Viren, die nur über ihre Replikation in der Zelle fusogen wirken, haben für die in-vitro-Fusion von Zellen keine Bedeutung erlangt.

Bei diesen klassischen Fusionsmethoden müssen Nachteile in Kauf genommen werden. Die unphysiologischen Bedingungen beeinträchtigen die Lebensfähigkeit der fusionierten Zellen. Die fusogenen Substanzen oder Viren können irreversible Veränderungen in den Membranen hervorrufen, da sie sich mit der gesamten Zelloberfläche über längere Zeit in Wechselwirkung befinden. Die Fusion läuft nicht synchron ab, und die Ausbeute ist meistens sehr gering. Die angewendeten Fusionsverfahren werden darüber hinaus mechanistisch nicht verstanden und variieren von Zellart zu Zellart, da sie durch empirische Ermittlung optimiert werden müssen. Diese Nachteile weisen auch Verfahren auf, die kürzlich bekannt wurden^[60, 61]. Hierbei werden die Zellen chemisch oder viral aneinandergelockt; die für die Induzierung der Fusion notwendige Störung in den Membranen wird durch Applikation eines überkritischen Feldpulses ausgelöst. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer leicht erhöhten Fusionsausbeute, wie Berg et al.^[60] sowie Neumann et al.^[61] gezeigt haben. Aus diesen Untersuchungen geht allerdings hervor, daß über den elektrischen Durchbruch von Zellmembranen Fusion ausgelöst werden kann. Diese Schlußfolgerung wird auch von Senda et al.^[62] bestätigt, die zeigen konnten, daß zwei Protoplasten, die durch Mikroelektroden zusammengehalten werden, nach Applikation eines Feldpulses miteinander fusionieren. Allerdings verwendeten diese Autoren Dextran in der Lösung, das ähnliche Eigen-

schaften wie Polyethylenglycol haben könnte. Dieses Verfahren dürfte keine praktische Anwendung finden, da die Fusionsausbeute a priori sehr gering ist.

Ein generell anwendbares Verfahren, mit dem Zellen unterschiedlicher Art, aber auch Lipidvesikel untereinander und Lipidvesikel mit Zellen fusioniert werden können, wurde in den beiden letzten Jahren von *Zimmermann* und *Scheurich* entwickelt^[13, 63–66] (Abb. 18). Die elektrisch induzierte Fusion beruht auf der ausschließlichen Verwendung von physikalischen Techniken und besteht im Prinzip aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wird durch Dielektrophorese ein enger Membrankontakt zwischen den zu fusionierenden Zellen hergestellt. Im zweiten Schritt wird die Fusion in den so hergestellten Zellaggregaten über den elektrischen Durchbruch ausgelöst.

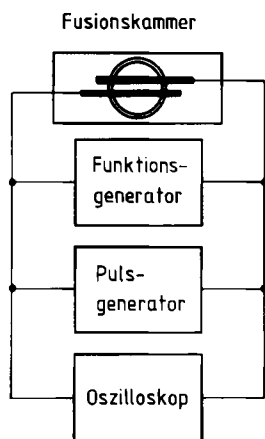


Abb. 18. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die elektrisch induzierte Fusion. Zwei Elektroden, die unter dem Mikroskop beobachtet werden können, sind parallel zueinander auf einen Objektträger aufgebracht. Frequenz und Amplitude der Dielektrophoresespannung (siehe Text) werden über einen Funktionsgenerator gesteuert; parallel hierzu ist ein Pulsgenerator geschaltet, über den der Durchbruchpuls ausgelöst wird. Die applizierten Spannungen werden auf einem Oszilloskop aufgezeichnet (Einzelheiten siehe [13]).

Die Dielektrophorese, die erstmalig von *Pohl* und *Crane*^[67, 68] auf lebende Zellen angewendet wurde, ist im Prinzip schon seit langem bekannt. Sie wird benutzt, um den Kraftlinienverlauf in einem elektrostatischen Feld z. B. mit in Öl suspendierten Grießkörnern sichtbar zu machen. Dieses Grießpulver ordnet sich dann längs der Feldlinien an. Die Orientierung der Grießkörner im Feld beruht auf einer Polarisierung der Materie.

Im Prinzip geschieht das gleiche mit einer Zelle, die sich in einem elektrischen Feld befindet (Abb. 18 und 19). In einem homogenen elektrischen Feld (Abb. 19a) erfahren die Zellen aufgrund ihrer Netto-Oberflächenladung eine Kraft und beginnen in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode zu wandern (Elektrophorese). Da die Oberfläche in der Regel negativ geladen ist, bewegen sich die Zellen in Richtung der Anode. Zusätzlich wird aber in den Zellen über Ladungstrennung oder durch Orientierung von Dipolen in der Membran ein Dipolmoment induziert, das zur Bewegung der Zellen allerdings nicht beiträgt, da die Menge der positiven und der negativen Ladung gleich groß ist und da die Feldstärke in einem homogenen Feld auf beiden Seiten der Zelle gleich ist; mit anderen Worten: Ein neutrales Teilchen würde in einem homogenen Feld nicht wandern (Abb. 19b). In einem inhomogenen elektrischen Feld dagegen tritt zwar nach

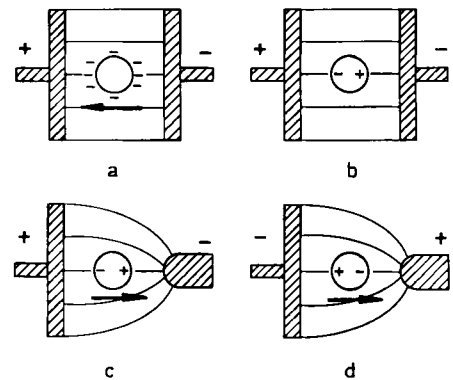


Abb. 19. Schematische Darstellung der Elektro- und Dielektrophorese. In einem homogenen elektrischen Feld (Plattenkondensator) wandern geladene Teilchen oder Zellen aufgrund ihrer Nettoladung auf der äußeren Oberfläche der Membran in Richtung einer Elektrode (Elektrophorese) (a). Die Wanderungsrichtung hängt vom Vorzeichen der Ladung und von der Richtung der externen Spannung ab. Zellen weisen im allgemeinen eine negative Oberflächenladung auf. Generell wird in einem dielektrischen Teilchen oder einer Zelle (unabhängig davon, ob diese Teilchen eine Nettoladung tragen oder nicht) ein Dipol induziert (b). Da die elektrische Feldstärke auf beiden Seiten des Teilchens oder der Zelle gleich groß ist (b), trägt diese induzierte Ladung nicht zur Wanderung bei. Nichtgeladene Teilchen können deshalb in einem homogenen Feld nicht wandern. In einem inhomogenen elektrischen Feld können dagegen auch nichtgeladene Teilchen wandern, da auf den elektrisch induzierten Dipol eine Nettokraft des elektrischen Feldes einwirkt (c); die Feldstärke auf beiden Seiten des Teilchens ist nicht gleich groß. Dieser Effekt wird Dielektrophorese genannt. Bei Umpolung der externen elektrischen Spannung zwischen den beiden Elektroden kehrt sich die dielektrophoretisch bedingte Wanderungsrichtung der Teilchen oder Zellen im Gegensatz zur Wanderungsrichtung bei der Elektrophorese nicht um (d) (siehe [13, 67]).

wie vor Elektrophorese auf, gleichzeitig wird aber auch eine Wanderung des neutralen Teilchens beobachtet, und zwar im Regelfall in Richtung höherer Feldstärke (Abb. 19c). Die Wanderung eines neutralen Teilchens in einem inhomogenen elektrischen Feld beruht darauf, daß die Feldstärke auf beiden Seiten des in der Zelle induzierten Dipols verschieden groß ist. Die resultierende Nettokraft zieht das Teilchen in Richtung höherer Feldstärke. Dieser Effekt wurde als Dielektrophorese bezeichnet^[67]. Die Richtung der Nettokraft ändert sich nicht, wie aus Abbildung 19d leicht zu ersehen ist, wenn man die Richtung des Feldes durch Umpolen der externen Spannung umkehrt. Die elektrophoretische Wanderung, die nur durch die Oberflächenladung einer Zelle bedingt ist, erfolgt dagegen in umgekehrter Richtung. In einem inhomogenen elektrischen Wechselfeld findet deshalb keine Wanderung von Zellen aufgrund ihrer Nettoladung mehr statt. Die Zellen oszillieren vielmehr um eine bestimmte Position im Feld, die Oberflächenladung ist „maskiert“. Nur die dielektrophoretisch bedingte Wanderung findet statt, wobei sich die Zellen längs der elektrischen Feldlinien in Richtung höherer Feldstärke bewegen. Die Kraft, die auf die Zelle unter dielektrophoretischen Bedingungen ausgeübt wird, hängt vom Quadrat der Feldstärke, vom Feldgradienten, vom Volumen des Teilchens, von der Differenz der Dielektrizitätskonstanten der Zelle und ihrer Umgebung (sowie der entsprechenden Differenz ihrer Leitfähigkeiten) ab. Diese Differenzen sind in der Regel positiv, so daß eine Wanderung der Zellen in das Gebiet höherer Feldstärke beobachtet wird. Unter bestimmten Bedingungen kann die Differenz der Dielektrizitätskonstanten negativ werden; dann ist eine negative Dielektrophorese, d. h. Wanderung in ein Gebiet geringerer Feldintensität, zu beobachten. Die Ursache hierfür ist darin zu sehen, daß die Dielektrizitätskonstante einer

Zelle (oder der Membran) eine Funktion der Frequenz ist, da die Membran (unter Einschluß der Grenzschichten zu den Lösungen hin) inhomogen ist^[67, 69]. Es kommt zu Grenzflächenpolarisationen, die sich makroskopisch in einer Änderung der Dielektrizitätskonstante widerspiegeln (Maxwell-Wagnersche Dispersion)^[69]. Deshalb kann bei bestimmten Frequenzen die Dielektrizitätskonstante der Zelle kleiner werden als die der umgebenden Lösung, wodurch negative Dielektrophorese hervorgerufen wird. Im allgemeinen wird eine positive Dielektrophorese im Frequenzbereich zwischen 1 kHz und 10 MHz beobachtet (Ausnahmen siehe ^[67]).

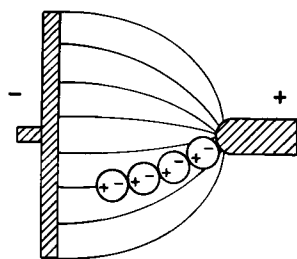


Abb. 20. Schematische Darstellung der Entstehung von Zellketten während der Dielektrophorese. Durch die Anziehung der in den Zellen induzierten Dipole lagern sich die Zellen entlang den elektrischen Feldlinien an der Elektrode in Kettenform an.

Wenn Zellen bei ihrer Wanderung in das Gebiet höherer Feldstärke sich längs der Feldlinien einander nähern, ziehen sie sich aufgrund ihrer Dipolmomente an (Abb. 20), so daß sie sich in Form von Zweier-, Dreier- und Viererketten (je nach Suspensionsdichte) zur Elektrode bewegen, wo sie sich in Form von Perlenketten längs der Feldlinien anordnen.

Diese Konfigurationen bleiben solange stabil, wie das externe Wechselfeld anliegt. Wird das Feld abgeschaltet, zerfallen die Ketten, da sich die Zellen aufgrund ihrer Ladung und der Brownschen Bewegung abstoßen. Die Dielektrophorese ist deshalb (wenn die Feldstärke nicht zu hoch wird, s. u.) ein reversibler Vorgang, der es ermöglicht, einen engen Membrankontakt zwischen den Zellen herzustellen.

Ein limitierender Faktor bei der dielektrophoretischen Aneinanderreihung von Zellen ist die elektrische Leitfähigkeit des Mediums. Wenn diese zu hoch ist, fließt ein zu großer Strom in der Lösung, der zu Wärmeentwicklung und damit zu Turbulenzen führt. Diese Turbulenzen verhindern die Bildung von „Perlenketten“. Daher muß möglichst in nicht-ionischen Lösungen (spezifische Leitfähigkeit $< 10^{-4}$ S cm^{-1}) gearbeitet werden. Die Osmolarität^[7] der Lösung muß über Nichtelektrolyte eingestellt werden. Tierische und pflanzliche Zellen können über längere Zeiten in Lösungen von Mannit, Saccharose, Glucose oder neutralen Aminosäuren gehalten werden, ohne daß es zu irreversiblen funktionellen Störungen in der Zelle oder in der Membran kommt^[13, 63-66].

Bei Zellen mit hoher spezifischer Dichte (z. B. Säugetierzellen, deren Kern bis zu 80% des Zellvolumens einnehmen kann) muß außerdem die Dichte des Außenmediums mit Percoll erhöht werden, da sich sonst die aneinandergereihten Zellen während und nach der Applikation des Durchbruchspulses mit ihren Membranen infolge der Schwerkraft gegenseitig verschieben.

[*] Hierunter versteht man die Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen.

Die elektrische Feldstärke für den Durchbruch der Membranen der dielektrophoretisch aneinandergelagerten Zellen muß überschritten werden, wie Theorie und Experiment gezeigt haben^[13, 63-66], um Fusion auszulösen. Die Länge des Feldpulses, der zur optimalen Fusion von Zellen oder auch Zellorganellen und Lipidvesikeln führt, hängt von den Eigenschaften der zu fusionierenden biologischen Systeme ab. Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, liegt der optimale Pulslängenbereich für pflanzliche Protoplasten oder auch isolierte Vakuolen zwischen 15 und 50 μs , für Säugetierzellen (z. B. Friend-Zellen und menschliche Erythrocyten) zwischen 1 und 4 μs . Außerhalb der angegebenen Bereichsgrenzen wird außer in vereinzelt Fällen keine Fusion beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte in der zell- und membranspezifischen Pulslängenabhängigkeit der Durchbruchsspannung zu suchen sein (vgl. Abb. 7 und 8). Im optimalen Pulslängenbereich wird für pflanzliche wie auch tierische Zellen dagegen Fusion annähernd aller Zellen beobachtet, deren Membranen der Durchbruchsspannung ausgesetzt wurden. Die elektrisch induzierte Fusion ist in Abbildung 21 für Mesophyllzellprotoplasten aus Hafer (*Ave-*

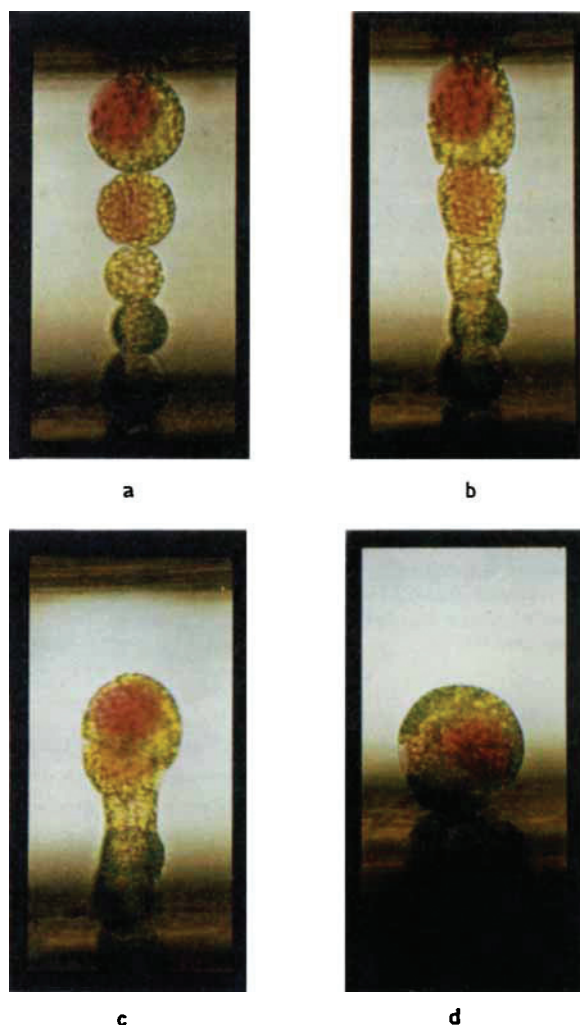


Abb. 21. Elektrisch induzierte Zellfusion von Mesophyllzellprotoplasten aus *Avena sativa*, die teilweise mit Neutralrot angefärbt sind. Neutralrot ist ein Vitalfarbstoff, der in der Vakuole akkumuliert wird. Die Zellen wurden in 0,5 M Mannitlösung suspendiert und an den Elektroden der Fusionskammer über Dielektrophorese gesammelt (a). Die Fusion wurde durch einen elektrischen Feldpuls von 20 μs Dauer ausgelöst, dessen Intensität so hoch war, daß elektrischer Durchbruch in der Membrankontaktzone auftrat. Die Bilder zeigen den Verlauf der Fusion 10 s (b), 300 s (c) und 600 s (d) nach dem Durchbruchspuls [63]. 1 cm = 50 μm .

Tabelle 1. Elektrisch induzierte Fusion [a].

Fusion zwischen Zelle 1	Zelle 2	Medium	Min. Elektroden- abstand [μm]	Dielektrophoret. max. Feldstärke [V/cm] [b]	Sammlung		Durchbruchspuls		Fusions- dauer [min]	Bem.
					Frequenz [MHz]		Feldstärke [V/cm] [b]	Dauer [μs]		
Mesophyll- protoplast, Hafer	wie 1	0.5 M Mannit	200	200	0.5		750	20	3–10	vgl. [63]
Mesophyll- protoplast, Bohne	wie 1	0.5 M Mannit	200	200	0.5		750	50	30–60	vgl. [13]
Mesophyll- protoplast, Petunie	wie 1	0.5 M Mannit	200	200	0.5		750	50	30–60	[c]
Schließzell- protoplast, Bohne	Mesophyll- protoplast, Bohne	0.6 M Mannit	200	200	0.5		2000	50	20–40	vgl. [64]
Mesophyll- protoplast, Brutblatt	wie 1	0.3 M Sorbit	300	70	1		570	20	0.5	[d] vgl. [65]
Mesophyll- protoplast, Brutblatt	Vakuole Brutblatt	0.3 M Sorbit	300	70	1		500	20	0.5	[d] vgl. [65]
Vakuole, Brutblatt	wie 1	0.4 M Sorbit	300	50	1		500	20	0.1–0.2	[d] vgl. [65]
Mesophyll- protoplast, Hafer	wie 1 [i]	0.5 M Mannit	200	200	0.5		750	20	3–10	[d] vgl. [65]
Mesophyll- protoplast, Brutblatt	Mesophyll- protoplast, Hafer	0.4 M Sorbit	300	70	1		570	20	1	[d] vgl. [65]
Menschl. Erythrocyten [e]	wie 1	0.3 M Glucose	100	1000	2		2200	4	2–4	vgl. [66]
Friend- Zellen [f]	wie 1	0.3 M Glucose	100	1000	2		2200	1–2	5–50 [g]	
Liposomen, Durchmesser $\approx 10 \mu\text{m}$ [h]	wie 1	0.075 M Saccharose	300	330	2		660	20	<0.1	

[a] Pflanzen: Hafer (*Avena sativa*), Bohne (*Vicia faba*), Petunie (*Petunia inflata*), Brutblatt (*Kalanchoe daigremontiana*). [b] Die Feldstärke wurde unter Annahme eines homogenen Feldes errechnet. [c] P. Scheurich, U. Tisljar, U. Zimmermann, unveröffentlichte Ergebnisse. [d] Die Dichte der Lösungen wurde mit 45% Percoll oder 5% Ficoll erhöht (pH = 7.0). [e] Vorbehandlung mit Pronase (1 mg/cm³) oder Neuraminidase (4 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). [f] Vorbehandlung mit Pronase (1 mg/cm³); G. Pilwat, U. Zimmermann, P. Scheurich, unveröffentlichte Ergebnisse. [g] Die Fusionsdauer ist abhängig vom Medium (vgl. Text und Abb. 23). [h] Unilamellare Lipidvesikel; als Lipid wurde Asolectin oder Eiphsphatidylcholin verwendet; R. Benz, P. Scheurich, J. Vienken, U. Zimmermann, unveröffentlichte Ergebnisse. [i] Es wurden Protoplasten, die unter Dunkel- bzw. Lichtbedingungen angezogen wurden, miteinander fusioniert. Unter Lichtbedingungen liegen Chloroplasten vor, unter Dunkelbedingungen Etioplasten (Vorstufen der Chloroplasten).

na sativa), in Abbildung 22 für eine Vakuole und Mesophyllprotoplasten von *Kalanchoe daigremontiana* und in den Abbildungen 23 bzw. 24 für Friend-Zellen bzw. menschliche Erythrocyten dargestellt. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 1 angegeben. Die Fusionszeit nach Applikation des Durchbruchspulses variiert von Sekunden bis zu 60 Minuten (Tabelle 1). Die Ursache hierfür wird noch nicht verstanden; sie ist aber sicherlich auf die unterschiedliche Membranfluidität der einzelnen Zellarten und auf die Eigenschaften des Cytoskeletons (Fibrillensystem) der Zelle zurückzuführen. Bestimmend für die Dauer des Fusionsprozesses ist sicherlich auch, inwieweit die Zellwand bei pflanzlichen Protoplasten und die Glycocalixschicht auf der äußeren Membranoberfläche von tierischen Zellen enzymatisch abgebaut wurde. Die Bedeutung der Entfernung dieser Schichten wird deutlich, wenn z. B. Erythrocyten nach dielektrophoretischer Orientierung einer kritischen Feldpulsfrequenz von längerer

Dauer (einige Sekunden) ausgesetzt werden^[70]. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer irreversiblen Membranfusion unter Bildung langer Schläuche (entsprechend der Länge der Zellkette). Eine eigentliche Zellfusion, d. h. Abrundung unter Bildung einer einzigen Zelle, findet aber nicht statt. In welchem Ausmaß diese Erythrocytenschläuche, die 200 μm und länger werden und sogar die beiden Elektroden überbrücken können, für den intrazellulären Stofftransport durchlässig sind, ist noch nicht bekannt.

Für größere Zellen wie Protoplasten und Friend-Zellen läßt sich nachweisen, daß das Volumen der fusionierten Zellen der Summe der Volumina der einzelnen Zellen entspricht, unabhängig von der Zahl der fusionierten Zellen (siehe Abb. 21a, d und 22a, d). Man beobachtet, daß nach den Plasmalemmamembranen auch die Tonoplastenmembranen, die die Vakuolen begrenzen, fusionieren. Der Farbstoff Neutralrot wird, wie aus der Literatur bekannt ist, aus-

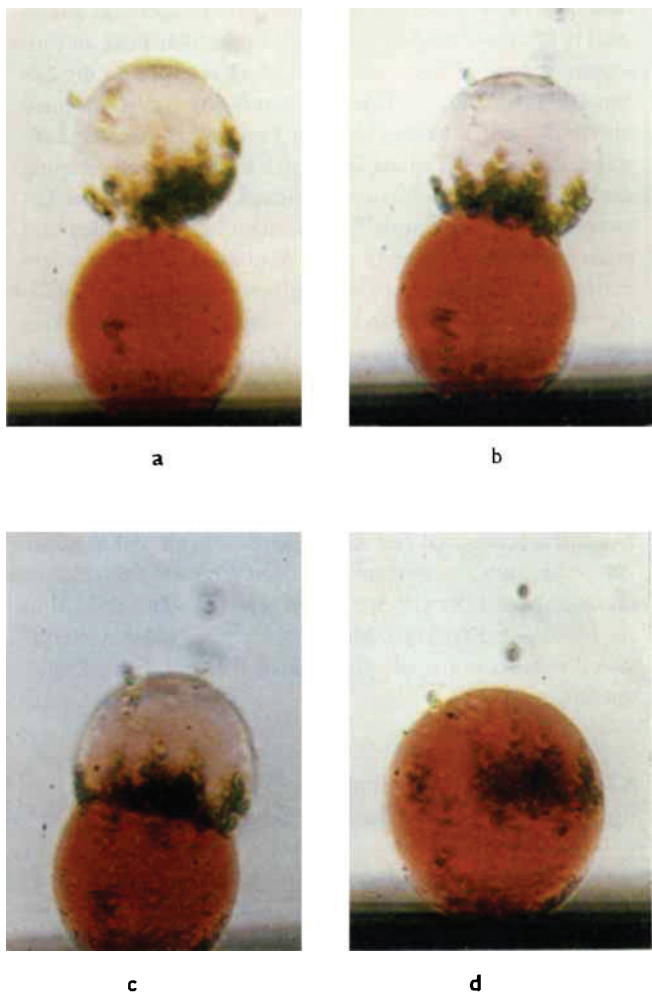


Abb. 22. Elektrisch induzierte Fusion zwischen einer Vakuole und Mesophyllzellprotoplasten von *Kalanchoe daigremontiana* (Bedingungen siehe Tabelle 1) vor dem Durchbruchspuls (a), 12 s (b), 15 s (c) und 30 s (d) nach dem Durchbruchspuls. 1 cm = 35 μm [65].

schließlich in der Vakuole akkumuliert. Neutralrot ist ein Vitalfarbstoff, d. h., er führt zu keinen irreversiblen Änderungen.

Die Fusion von menschlichen Erythrocyten bietet besonders faszinierende Anwendungen, wenn sie unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen durchgeführt wird. Bei hohen Suspensionsdichten erhält man eine Vielzahl von aneinandergelagerten, in sehr engem Kontakt stehenden Zellketten (Abb. 24a). Der Durchbruchspuls führt zur Bildung von Riesenerythrocysten (Abb. 24b), die einen Durchmesser bis zu 200 μm haben können (normaler Durchmesser 7–8 μm)^[66]. Durch Zugabe von isotoner Elektrolytlösung nach der Fusion lassen sich diese Riesenerythrocysten mit speziellen Vorrichtungen, die auf dem Prinzip der Druckmeßsonde^[2,30] beruhen, isolieren und untersuchen. Die Bildung von Riesenerythrocysten scheint zunächst der Modellvorstellung, die für die elektrisch induzierte Fusion in Abbildung 17 entwickelt wurde, zu widersprechen. Danach sollte Durchbruch nur in den Polbereichen, d. h., in den Membranbereichen in der Kontaktzone längs der Feldlinien auftreten. Da aber der elektrische Durchbruch nach Untersuchungen an künstlichen Lipidfilmen innerhalb von 10 ns abläuft, erscheint es nicht unwahrscheinlich, daß aufgrund der durch die Zellen greifenden Feldlinien und der Verzerrung des äußeren elektrischen Feldes durch die hohe Packungsdichte der Zellen

die Durchbruchsspannung auch in den Membranbereichen senkrecht zu den Elektroden erreicht wird.

Bei permanenten Zelllinien wie den in Abbildung 23 gezeigten Friend-Zellen ist es interessant zu vermerken, daß sich die Zellen nach der Fusion nur dann rasch abrunden, wenn sie aus der Glucose-Lösung in Nährmedium überführt werden.

Weiterhin ist erwähnenswert, daß auch Organellen wie Chloroplasten (Ort der Photosynthese) und Mitochondrien (Ort der Energieerzeugung) elektrisch fusioniert werden können, obgleich diese Organellen zwei Membransysteme, die direkt hintereinandergeschaltet sind, aufweisen. Künstliche Lipidvesikel lassen sich ebenfalls durch elektrische Fusion zu Riesenvesikeln mit Durchmessern von 100 μm und mehr verschmelzen.

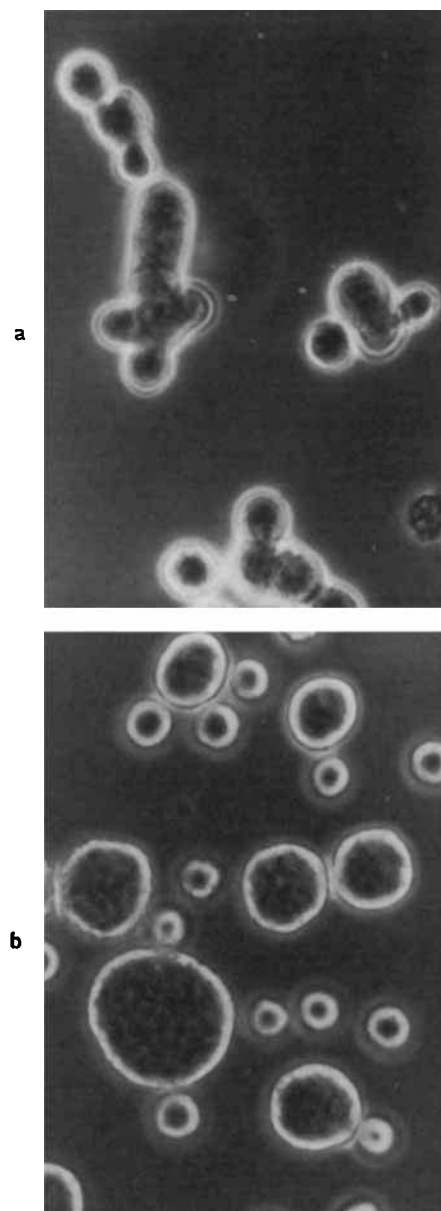


Abb. 23. Phasenkontrastaufnahmen von elektrisch fusionierten Friend-Zellen. Die Zellen wurden nach Vorbehandlung mit Pronase P (37 °C, 1 mg/cm², 5 min) zur Ablösung der Glycocalix in 0.3 M Glucoselösung in der Fusionskammer suspendiert und dielektrophoretisch gesammelt. 1 min nach Applikation des Durchbruchspulses (Dauer 2 μs) wurden die Zellen aus der Kammer mit einer speziell konstruierten Mikropipette entnommen. 2 min nach der Induktion der elektrischen Fusion liegen neben fusionierten Aggregaten einzelne Zellen vor, die nicht dem Feldpuls ausgesetzt waren (a). Wenn die Zellen in Nährmedium überführt werden, runden sich die Fusionsaggregate innerhalb von 10 min ab (b). 1 cm = 20 μm .

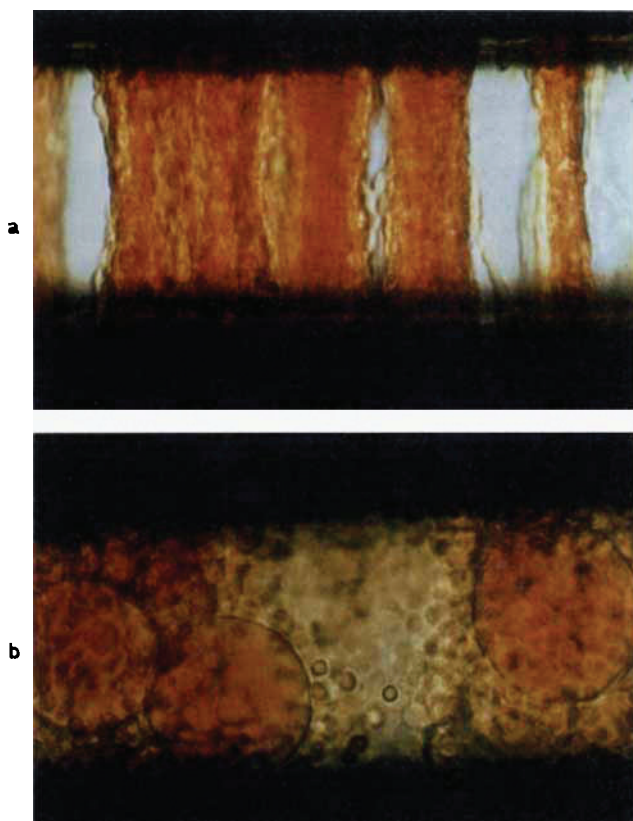


Abb. 24. Elektrisch induzierte Fusion von menschlichen Erythrocyten. Die Glycocalixschicht wurde mit Neuramidase entfernt (37°C , $4\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 10 min). Anschließend wurden die Zellen in 0.3 M Glucoselösung suspendiert und zwischen den Elektroden dielektrophoretisch gesammelt (a). Die Suspensionsdichte wurde so hoch gewählt, daß sich viele Erythrocytenketten parallel anordneten und Membrankontakt hatten. Applikation von zwei Durchbruchspulsen (Dauer $4\text{ }\mu\text{s}$) führte zur Entstehung von Riesenerthrocyten (Durchmesser bis $200\text{ }\mu\text{m}$) (b). Signifikante Hämolyse bei der Bildung der Riesenerthrocyten tritt nicht auf. Sie erscheinen auch im Phasenkontrast optisch homogen [66]. $1\text{ cm} = 30\text{ }\mu\text{m}$.

Fusion zwischen Zellen verschiedener Arten und zwischen Lipidvesikeln und Zellen konnte inzwischen ebenfalls nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1). Das heißt: zum jetzigen Stand der Technik kann gefolgert werden, daß die elektrische Fusion ein generelles Verfahren ist, mit dem Zellen und künstliche Lipidvesikel unterschiedlicher Art fusioniert werden können. Neben der hohen Ausbeute ist es vorteilhaft, daß die Fusion synchron abläuft, da sie durch einen Puls ausgelöst wird. Demnach sollten sich die unbekannten Zwischenschritte des Fusionsprozesses in der Membran durch elektronenmikroskopische Techniken in Zukunft untersuchen lassen. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß Feldänderungen in der Membran auch bei der Fusion von Zellen auf chemischem Weg oder unter Verwendung von Viren eine Rolle spielen.

Da die elektrisch induzierte Fusion sehr schonend ist (nur kleine Membranzonen werden für eine äußerst kurze Zeitdauer beeinflusst), sollte die Lebensfähigkeit der fusionierten Zellen zufriedenstellend sein. In der Tat konnte für Friend-Zellen nachgewiesen werden, daß sie nach der Fusion wachsen und daß sich die Hämoglobinsynthese durch Zugabe von Dimethylsulfoxid induzieren läßt^[50]. Umfangreiche Untersuchungen liegen für pflanzliche Protoplasten von *Petunia inflata* vor. Für diese Pflanze konnte von mehreren Autoren^[3] gezeigt werden, daß einzelne Mesophyllzellprotoplasten eine „Totipotenz“ aufweisen: Es besteht die Möglichkeit, daß unter Bildung von Zellwänden und sich anschließenden Zell-

teilungen (in Verbindung mit einer Differenzierung) ganze, intakte Pflanzen erhalten werden^[3]. Fusionsversuche an Protoplasten dieser Pflanze sind besonders reizvoll, da die Lebensfähigkeit der fusionierten Aggregate relativ schnell überprüft werden kann. Optimale Voraussetzungen für Zellwandbildung und Teilung lassen sich durch Immobilisierung der fusionierten Protoplasten erreichen. Wie in unserem Laboratorium gezeigt wurde^[71-73], können tierische Zellen und pflanzliche Protoplasten in einer Alginat-Matrix, die in dem entsprechenden Nährmedium aufbewahrt wird, immobilisiert werden. Die Alginat-Matrix wird durch ionische Vernetzung mit Calcium-Ionen gehärtet. Mit dieser Technik fanden wir, daß die elektrisch fusionierten Protoplasten von *P. inflata* imstande sind, Zellwände zu bilden und sich auch zu teilen. Für weitere Züchtungsversuche können diese immobilisierten Zellen wieder aus der Alginat-Matrix durch Zugabe eines Calcium-Komplexbildners freigesetzt werden. Mit Citrat lassen sich fast alle Zellen schonend und in hoher Ausbeute zurückgewinnen^[71-73]. Versuche an Seeigelleiern (zusammen mit der Gruppe H. Passow, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main) haben gezeigt, daß nach Fusion die Befruchtung der fusionierten Eier mit Spermia noch abläuft.

5. Potentielle Anwendungen des elektrischen Membrandurchbruches

Die Membrandurchbruchsspannung läßt sich als Kriterium für Änderungen in der Membranstruktur oder -zusammensetzung unter zellbiologischen und medizinischen Aspekten heranziehen. Die Variation im Verteilungsspektrum der Durchbruchsspannung während des Wachstumszyklus einer Zellpopulation (Abb. 11) deutet darauf hin, daß sich die Änderungen in den elektro-mechanischen Eigenschaften der Zellmembran während des Wachstums von Zellen in einer Änderung der Durchbruchsspannung widerspiegeln. Bei Zellen von *Escherichia coli* nimmt die mittlere Durchbruchsspannung beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase ebenfalls zu, wie frühere Untersuchungen mit dem Partikelanalysator (siehe Abb. 9b) gezeigt haben^[19]. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, daß spezifische Wachstumsphasen über die Durchbruchsspannung charakterisiert werden können – ein medizinisch und zellbiologisch reizvoller Aspekt, da sich die Wachstumsphasen bis jetzt nur über Anfärbung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen unter Verwendung eines Impulscytophotometers erfassen lassen^[74]. Änderungen in der Durchbruchsspannung als Folge von Differenzierungsprozessen sind ebenfalls bekannt. Pilwat et al.^[75] haben nachgewiesen, daß die Durchbruchsspannung bei der Entwicklung von Haferchloroplasten aus der Vorstufe der Etioplasten signifikant abnimmt. Die Chloroplastenentwicklung wird durch Belichtung von Pflanzen, die unter Dunkelbedingungen angezüchtet wurden, im Verlauf von 48 h induziert. Die Abnahme in der Durchbruchsspannung in Abhängigkeit von der Belichtungszeit wurde durch vermehrten Einbau von Transportproteinen in die Zellmembranen der Chloroplasten gedeutet. Klinisch relevant ist der Nachweis, daß bestimmte Lokalanästhetika die Durchbruchsspannung von Erythrocytenmembranen verändern können. Steigende Konzentrationen von Benzylalkohol senken die Durchbruchsspannung um mehr als 50%^[76,77]. Einschränkung muß aller-

dings hinzugefügt werden, daß die Durchbruchsspannung planarer, künstlicher Lipidmembranen anscheinend nur wenig durch Zugabe von Agentien beeinflusst werden kann. Umfangreiche Untersuchungen unter Einbeziehung des erst seit kurzem bekannten Befundes, daß die Durchbruchsspannung pulslängenabhängig ist, sind sicherlich notwendig, um zu einer abschließenden Aussage zu kommen. Darüber hinaus erscheint es auch nicht ausgeschlossen, daß künstliche Lipidvesikel in ihren Durchbruchseigenschaften auf chemische Veränderungen empfindlicher reagieren als planare Membranen. Die Interpretation des elektrischen Durchbruches als Folge einer lokalen elektro-mechanischen Kompression unter Bildung von Poren legt es nahe, daß elastische und mechanische Kräfte in der Membran eine Rolle spielen (s. o.). Der kleine Krümmungsradius von Lipidvesikeln und Zellen und die elastischen Kräfte in der Membran könnten den Wert der Durchbruchsspannung beträchtlich beeinflussen, wenn mechanische und elastische Größen der Membran über Zugabe von Substanzen verändert werden. Die Entwicklung des Partikelanalysators für Messungen an individuellen Zellen (Abb. 9d) ermöglicht in Zukunft detaillierte Untersuchungen dieser Art an Phospholipidvesikeln, deren chemische Zusammensetzung, Ladung und Vernetzungsgrad variieren (siehe auch ^[12a])^[34,35,78-80].

Generell läßt sich feststellen, daß der heutige Trend in der medizinischen Technik in Richtung auf die Entwicklung von Multiparameter-Analysegeräten geht, d. h. von Einrichtungen, die es ermöglichen, eine Reihe von charakteristischen Membran- und Zellparametern an einzelnen Zellen in einem Prozeßschritt zu messen^[81-83]. Beim vorliegenden Verfahren (Abb. 9d) können gleichzeitig an einzelnen Zellen ohne weitere Manipulationen (z. B. Anfärbung) das Volumen, die Durchbruchsspannung der Membran und die scheinbare Unterbewertung des Zellvolumens nach dem Durchbruch erfaßt werden. Die scheinbare Unterbewertung des Zellvolumens ist nach entsprechender Kalibrierung als direktes Maß für das Profil der intrazellulären Leitfähigkeit zu verwenden (s. o.). Formal spiegelt die Unterbewertung das Verhältnis von nichtleitendem zu leitendem Raum in der Zelle wider. Dieses Verhältnis hängt einerseits von der Größe und den Eigenschaften der intrazellulären Kompartimente, andererseits von der Leitfähigkeit des Cytoplasmas ab, das seinerseits über die biochemische Aktivität in der Zelle empfindlich reguliert wird. Nach Messungen an menschlichen Erythrocyten, die mit der Feldpuls-methode mit Nichtelektrolyten oder Elektrolyten beladen wurden, kann der Grad der Äquilibration des Zellinnern mit der Außenlösung direkt über die Messung der scheinbaren Unterbewertung der Zelle im Partikelanalysator verfolgt werden^[10]. Bei entsprechender Eichung läßt sich mit dieser Methode auch der Proteingehalt der Zelle erfassen. Besonders einfach – für die klinische Anwendung aber von größtem Interesse – sind derartige Untersuchungen an menschlichen Erythrocyten, da sie keinen Kern und andere intrazelluläre Kompartimente aufweisen. *Pilwat* und *Zimmermann* (siehe z. B. ^[48]) konnten in Übereinstimmung mit der Literatur zeigen, daß der Hämoglobingehalt von Erythrocyten verschiedenen Alters, die über Trennung durch einen Dichtegradienten (Percoll) erhalten wurden, vom Volumen und damit vom Alter unabhängig ist. Der neue Partikelanalysator (Abb. 9d) ermöglicht es demnach in Zukunft, pathologische Veränderungen im Hämoglobingehalt von einzelnen Zellen in einer Erythrocytenpo-

pulation (z. B. durch Anämien) frühzeitig und routinemäßig festzustellen.

Die feldinduzierte Einschleusung von membran-impermeablen Substanzen in das Zellinnere und die damit verbundene Möglichkeit, das Funktionsspektrum der Zelle zu manipulieren, bietet eine Reihe von zellbiologisch interessanten Aspekten. Zwei potentielle Anwendungen, an denen heute bereits gearbeitet wird, seien zur Verdeutlichung genannt:

Spezifische Reaktionsstellen (sites) in Trägersystemen der Membran (carrier) oder Zwischenstufen in biochemischen und biophysikalischen Reaktionsketten, die asymmetrisch in der Membran angeordnet sind, können über gezielte Einschleusung von spezifisch wirkenden Substanzen (z. B. Inhibitoren) lokalisiert und identifiziert werden. Da sich Proteine und Enzyme über den elektrischen Durchbruch reversibel in Zellen einführen lassen^[21], sind Experimente in greifbare Nähe gerückt, in denen z. B. das System Luciferin/Luciferase in Zellen eingeschleust werden könnte, um direkt den ATP-Umsatz in der Zelle zu bestimmen. Der ATP-Umsatz wird in der Regel durch Verwendung von Inhibitoren und Entkopplern der Phosphorylierung bestimmt, wobei Nebenreaktionen und unspezifische Wechselwirkungen mit der Plasmamembran allerdings nicht immer eindeutig auszuschließen sind.

Faszinierende Perspektiven bieten Zellen mit manipuliertem Funktionsspektrum für klinische Diagnostik und Therapie. Bis auf wenige Ausnahmen wirken Arzneimittel (Hormone, Antibiotica, Enzyme, Radionuclide etc.) nicht zell-, gewebe- oder organspezifisch. Die Entwicklung von Trägersystemen, die Pharmaka spezifisch zu einem Wirkungsort transportieren und dort zeitlich kontrolliert freisetzen oder die als Depotsysteme für längere Zeit in der Blutbahn zirkulieren, sind ein hochaktueller Forschungszweig in der biomedizinischen Technik (siehe ^[10,79,84-87]).

Die bisherigen Arbeiten konzentrierten sich auf die Entwicklung von künstlichen Trägersystemen (z. B. Liposomen, Mikrokapseln, Bindung an Polymere). Trotz vielversprechender Teilerfolge sind wir allerdings noch immer weit vom Ziel der klinischen Anwendung entfernt. Verträglichkeit mit dem Organismus, immunologische Reaktionen, mangelnde Selektivität und Lebensdauer der Trägersysteme sind nur einige der zahlreichen Probleme, die gelöst werden müssen^[10,79,84-87]. Zelluläre Trägersysteme bieten a priori eine Reihe von Vorteilen, insbesondere, da nennenswerte immunologische Reaktionen ausbleiben sollten.

Versuche an Mäusen mit Erythrocyten, die elektrisch mit Wirkstoffen beladen wurden, bestätigen die adäquaten Eigenschaften eines zellulären Trägersystems^[9,10,12,49,84]. Erythrocyten, die sich bei geeigneter Wahl der Feldbedingungen ohne nennenswerten Verlust von Hämoglobin und anderen intrazellulären Komponenten beladen ließen, zirkulierten nach intravenöser Injektion zu einem hohen Prozentsatz in der Blutbahn^[10,88]. Die Lebensdauer dieser manipulierten Zellen hat die gleiche Größenordnung wie bei intakten Mauseerythrocyten. Wenn andererseits die Feldbedingungen so gewählt werden, daß der Hämoglobingehalt nach dem Regenerierungsprozeß sehr niedrig ist (Schatten-Zellen, Ghost-Zellen) und die Zellen sich im mittleren Volumen von intakten Zellen unterscheiden, wird das eingeschlossene Pharmakon (z. B. Methotrexat, ein Cytostatikum, das einen wichtigen Schritt in der Synthese von Purin hemmt) spezifisch zur

Leber transportiert^[9,12,84]. Die manipulierten Erythrocyten werden unter diesen Bedingungen in Milz und Leber als Fremdkörper erkannt und abgebaut, so daß das Medikament gezielt in diesen Organen akkumuliert wird. Durch simultanen feldinduzierten Einschluß von Pharmakon und kleinen magnetischen Teilchen (Durchmesser 10 nm) in Erythrocyten lassen sich prinzipiell Trägersysteme mit anderen organspezifischen Eigenschaften entwickeln. Durch externe magnetische Führung können derartige „magnetische“ Erythrocyten zu vielen Stellen im Organismus dirigiert werden. Experimente an Mäusen haben gezeigt^[10], daß dieses Verfahren im Prinzip funktioniert und daß die freigesetzten Magnetteilchen vom Körper eliminiert werden können, ohne daß es zu toxischen Reaktionen kommt^[10,89].

Die Fusion von Zellen über den elektrischen Durchbruch bietet völlig neue Aspekte für die Entwicklung von Pharmakon-Trägersystemen. Ghost-Zellen, die mit einem Pharmakon gefüllt sind, können mit intakten Erythrocyten, Lymphocyten oder anderen körpereigenen Zellen fusioniert werden. Da nach bisheriger Erkenntnis keine nennenswerten Verluste an intrazellulären Komponenten eintreten, lassen sich so Trägersysteme konzipieren, die eine lange Lebensdauer im Körper und möglicherweise völlig neue organspezifische Eigenschaften haben.

Besonders reizvoll könnten Trägersysteme sein, bei denen Erythrocyten mit Liposomen fusioniert werden. Liposomen können durch einfache chemische Verfahren mit Proteinen oder DNA (Genen) beladen werden^[85]. Durch den Einbau von Liposomen in die Erythrocytenmembran könnte gezielt, je nach chemischer Zusammensetzung der Liposomenmembran, die Erythrocytenmembran lokal so verändert werden, daß sie eine zeitlich (auch räumlich) kontrollierte Freisetzung der eingeschlossenen Substanz ermöglicht. Die Verwendung von Phospholipiden, die nach der Membranfusion durch UV-Strahlung chemisch vernetzt werden können, bietet eine weitere, vielversprechende Variante für ein optimales Pharmakon-Trägersystem^[34,35] (siehe hierzu auch ^[90]).

Die elektrisch induzierte Fusion eröffnet ganz allgemein völlig neue Perspektiven für Anwendungen in anderen Lebensbereichen, da sie sich im Unterschied zu herkömmlichen Methoden universell auf alle Zellen und künstliche Lipidvesikel anwenden läßt. Das schonende Verfahren und die hohe Ausbeute lassen eine hohe Lebensfähigkeit der fusionierten Zellen erwarten.

Wir stehen erst am Anfang dieser Entwicklung. Im Hinblick auf die bereits vorliegenden Erkenntnisse läßt sich aber schon heute eine Reihe von potentiellen Möglichkeiten für dieses Fusionsverfahren aufzeigen.

Denkbar ist eine Fusion von Protoplasten aus mehreren Pflanzen, um zu Pflanzen mit neuen Eigenschaften zu gelangen, die z. B. höhere Erträge bringen oder eine erhöhte Salztoleranz aufweisen. Salztolerante Mutanten von Sojabohnen sind bekannt^[91]. In mehreren Laboratorien wird deshalb versucht, durch Fusion von Protoplasten dieser Mutante mit Protoplasten anderer Kulturpflanzen ein lebensfähiges Zellhybrid zu gewinnen, aus dem sich eine Pflanze mit den kombinierten Eigenschaften beider Pflanzen züchten läßt.

Die Übertragung des Gens aus Bakterien, das die Stickstoffbindung bewirkt, in pflanzliche Protoplasten über die elektrische Fusion ist ebenfalls technisch einer Lösung näher gekommen. Die Fusion von Protoplasten aus Hefezellen mit pflanzlichen Protoplasten bietet einen weiteren reizvollen

Aspekt für eine technische Anwendung. Hefezellen können bekanntlich Zucker zu Alkohol abbauen. Mit immobilisierten Hefezellen in vernetzten polymeren Matrizen läßt sich Alkohol bereits in kontinuierlichen Verfahren gewinnen (siehe hierzu ^[92-95]). Pflanzliche Protoplasten können andererseits Kohlendioxid und Wasser mit Sonnenenergie in Zucker (und Stärke) umwandeln. Ein Zellhybrid, das die Eigenschaften beider Zellen enthält, sollte deshalb imstande sein, Kohlendioxid und Wasser mit Sonnenenergie direkt in Ethanol umzuwandeln. Ein derartiges Zellsystem hätte, wenn es in technischem Maße angewendet werden könnte, weitreichende Konsequenzen für die Lösung unserer heutigen Energieprobleme. Sicherlich sind erhebliche Schwierigkeiten zu überwinden, bis diese Ziele technisch erreicht sind. Insbesondere muß geprüft werden, inwieweit die cytoplasmatischen Eigenschaften, das genetische Material und andere Zellfaktoren bei der Fusion von Zellen unterschiedlicher Herkunft miteinander kompatibel sind. Selbst im Falle eines Scheiterns der anvisierten technischen Anwendungen dürfte aber aus derartigen Untersuchungen eine Vielzahl von neuartigen Impulsen für die Zellbiologie und für die Erforschung von Membranstruktur und -funktion resultieren. Hieraus könnten sich neue Anwendungen ergeben, die heute noch nicht erkennbar sind.

Die in diesem Beitrag aufgeführten Arbeiten wurden teilweise durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Wir danken Prof. Dr. Göbel, Universität Würzburg, für die Überlassung der Friend-Zellen. Unser besonderer Dank gilt Frau S. Alexowsky für das Schreiben des Manuskriptes.

Eingegangen am 20. Januar 1981 [A 360]

- [1] G. B. Brown, G. Manecke, L. B. Wingard, Jr.: Enzyme Engineering. Vol. 4. Plenum Press, New York 1978.
- [2] U. Zimmermann, E. Steudle, Adv. Bot. Res. 6, 45 (1978).
- [3] W. Klingmüller: Genmanipulation und Gentherapie. Springer, Berlin 1976, S. 193.
- [4] M. H. Saier, Jr., C. D. Stiles: Molecular Dynamics in Biological Membranes. Springer, Berlin 1975.
- [5] P. J. Quinn: The Molecular Biology of Cell Membranes. Macmillan Press, London 1976.
- [6] G. Poste, G. L. Nicholson: Cell Surface Reviews. Vol. 5. North Holland, Amsterdam 1976.
- [7] N. R. Ringertz, R. E. Savage: Cell Hybrids. Academic Press, New York 1976.
- [8] U. Zimmermann, J. Schultz, G. Pilwat, Biophys. J. 13, 1005 (1973).
- [9] U. Zimmermann, G. Pilwat, Z. Naturforsch. C 31, 732 (1976).
- [10] U. Zimmermann in E. Goldberg, L. Donaruma, O. Vogl: Targeted Drugs. Wiley, New York, im Druck.
- [11] U. Zimmermann, Chem. Labor. Betr. 28, 505 (1977).
- [12] U. Zimmermann, J. Vienken, G. Pilwat, Bioelectrochem. Bioenerg. 7, 554 (1980).
- [12a] L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, Angew. Chem. 93, 311 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, Nr. 4 (1981).
- [13] U. Zimmermann, P. Scheurich, Planta 151, 26 (1980).
- [14] S. J. Singer, J. L. Nicolson, Science 175, 720 (1972).
- [15] N. Higinbotham, Annu. Rev. Plant Physiol. 24, 25 (1973).
- [16] U. V. Lassen, O. Sten-Knudsen, J. Physiol. (London) 195, 681 (1968).
- [17] G. Adam, P. Läger, G. Stark: Physikalische Chemie und Biophysik. Springer, Berlin 1977.
- [18] R. Benz: Künstliche Lipidmembranen: Modelle für biologische Membranen? Konstanzer Universitätsreden, Universitätsverlag Konstanz 1980.
- [19] U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann, Biophys. J. 14, 881 (1974).
- [20] U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Beckers, F. Riemann, Bioelectrochem. Bioenerg. 3, 58 (1976).
- [21] U. Zimmermann, F. Riemann, G. Pilwat, Biochim. Biophys. Acta 436, 460 (1976).
- [22] J. Vienken, E. Jeltsch, U. Zimmermann, Cytobiologie Z. Exp. Zellforsch. 17, 182 (1978).
- [23] D. Auer, G. Brandner, W. Bodemer, Naturwissenschaften 63, 391 (1976).

- [24] U. Zimmermann, G. Pilwat, C. Holzapfel, K. Rosenheck, J. Membr. Biol. 30, 135 (1976).
- [25] R. Benz, U. Zimmermann, Biochim. Biophys. Acta 597, 637 (1980).
- [26] R. Benz, U. Zimmermann, Bioelectrochem. Bioenerg. 7, 723 (1980).
- [27] R. Benz, F. Beckers, U. Zimmermann, J. Membr. Biol. 48, 181 (1979).
- [28] R. Benz, P. Luger, J. Membr. Biol. 27, 171 (1976).
- [29] J. Y. Abidor, V. B. Arakelyan, L. V. Chernomordik, Yu. A. Chizmadzhev, V. F. Pastushenko, U. R. Tarasevich, Bioelectrochem. Bioenerg. 6, 63 (1979).
- [30] U. Zimmermann, Annu. Rev. Plant Physiol. 29, 121 (1978).
- [31] U. Zimmermann, G. Pilwat, A. Pequaux, R. Gilles, J. Membr. Biol. 54, 103 (1980).
- [32] A. Pequaux, R. Gilles, G. Pilwat, U. Zimmermann, Experientia 36, 565 (1980).
- [33] R. Benz, U. Zimmermann, Biochim. Biophys. Acta 640, 169 (1981).
- [34] H.-H. Hub, B. Hupfer, H. Koch, H. Ringsdorf, Angew. Chem. 92, 962 (1980); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, 938 (1980).
- [35] A. Akimoto, K. Dorn, L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, Angew. Chem. 93, 108 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, 90 (1981).
- [36] B. Gauger, F. W. Bentrup, J. Membr. Biol. 48, 249 (1979).
- [37] U. Zimmermann, F. Beckers, H. G. L. Coster, Biochim. Biophys. Acta 464, 399 (1977).
- [38] U. Zimmermann, R. Benz, J. Membr. Biol. 53, 33 (1980).
- [39] R. Benz, F. Conti, Biochim. Biophys. Acta, im Druck.
- [40] E. Jeltsch, U. Zimmermann, Bioelectrochem. Bioenerg. 6, 349 (1979).
- [41] J. Hurley, Biophys. J. 10, 74 (1970).
- [42] H. E. Kubitschek in J. R. Noris, D. W. Ribbons: Methods in Microbiology. Vol. 1. Academic Press, New York 1969, S. 593.
- [43] R. Thom, Dtsch. Med. Wochenschr. 94, 617 (1969).
- [44] R. Thom, A. Hampe, G. Sauerbrey, Z. Gesamte Exp. Med. 151, 331 (1969).
- [45] V. Kachel, J. Histochem. Cytochem. 24, 211 (1976).
- [46] G. Pilwat, U. Zimmermann, H. Schnabl in W. J. Lucas, J. Dainty: Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues. Elsevier/North Holland, Amsterdam 1980, S. 475.
- [47] U. Zimmermann, M. Groves, H. Schnabl, G. Pilwat, J. Membr. Biol. 52, 37 (1980).
- [48] U. Zimmermann, G. Pilwat, M. R. Groves, Dtsch. Pat.-Anm. P 2828232.8 (1978); US-Pat. 4220916 (erteilt Sept. 1980).
- [49] U. Zimmermann, G. Pilwat, J. Vienken, Recent Res. Cancer Res. 75, 265 (1980).
- [50] C. Friend, W. Scher, J. G. Holland, T. Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 378 (1971).
- [51] E. Neumann, K. Rosenheck, J. Membr. Biol. 10, 279 (1972).
- [51a] G. Pilwat, U. Zimmermann, noch unveroffentlicht.
- [52] A. Katchalsky, P. F. Curran: Nonequilibrium Thermodynamics in Biophysics. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1965.
- [53] H. Passow in C. Bishop, D. M. Surgenor: The Red Blood Cell. Academic Press, New York 1964, S. 71.
- [54] W. D. Stein: The Movement of Molecules Across Cell Membranes. Academic Press, New York 1967.
- [55] D. Danon in R. Goldman, M. Rockstein: The Physiology and Pathology of Human Aging. Academic Press, New York 1975, S. 95.
- [56] J. Teissie, T. Y. Tsong, J. Membr. Biol. 55, 133 (1980).
- [57] U. Zimmermann, G. Pilwat, Sixth International Biophysics Congress, Kyoto 1978, Abstr. IV-19-(H), S. 140.
- [58] K. N. Kao, M. R. Michayluk, Planta 115, 355 (1974).
- [59] Z. Toister, A. Loyer, J. Biol. Chem. 248, 422 (1973).
- [60] H.-E. Jacob, W. Forster, H. Berg, Z. Allg. Mikrobiol., im Druck.
- [61] E. Neumann, G. Gerisch, K. Opatz, Naturwissenschaften 67, 414 (1980).
- [62] M. Senda, J. Takeda, S. Abe, T. Nakamura, Plant Cell Physiol. 20, 1441 (1979).
- [63] U. Zimmermann, P. Scheurich, Biochim. Biophys. Acta 641, 160 (1981).
- [64] P. Scheurich, U. Zimmermann, H. Schnabl, Plant Physiol., im Druck.
- [65] J. Vienken, M. Ganzer, R. Hampp, U. Zimmermann, Physiol. Plant, im Druck.
- [66] P. Scheurich, U. Zimmermann, Naturwissenschaften 68, 45 (1981).
- [67] H. A. Pohl: Dielectrophoresis. Cambridge University Press, Cambridge 1978.
- [68] J. S. Crane, H. A. Pohl, J. Electrochem. Soc. 115, 584 (1968).
- [69] H. P. Schwan, Adv. Biol. Med. Phys. 5, 147 (1957).
- [70] P. Scheurich, U. Zimmermann, M. Mischel, I. Lamprecht, Z. Naturforsch. C 35, 1081 (1980).
- [71] G. Pilwat, P. Washausen, J. Klein, U. Zimmermann, Z. Naturforsch. C 35, 352 (1980).
- [72] P. Scheurich, H. Schnabl, U. Zimmermann, Biochim. Biophys. Acta 598, 645 (1980).
- [73] H. Schnabl, P. Scheurich, U. Zimmermann, Planta 149, 280 (1980).
- [74] W. Gohde, W. Dittrich, Acta Histochem. 10, 429 (1971).
- [75] G. Pilwat, R. Hampp, U. Zimmermann, Planta 147, 396 (1980).
- [76] U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann in U. Zimmermann, J. Dainty: Membrane Transport in Plants. Springer, Berlin 1974, S. 146.
- [77] G. Pilwat, U. Zimmermann, F. Riemann, Biochim. Biophys. Acta 406, 424 (1975).
- [78] D. Day, H. H. Hub, H. Ringsdorf, Isr. J. Chem. 18, 325 (1979).
- [79] H. Ringsdorf in R. J. Kostelnick: Midland Macromolecular Monographs. Vol. 5. Gordon and Breach, London 1978, S. 197.
- [80] H. Bader, H. Ringsdorf, J. Skura, Angew. Chem. 93, 109 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, 91 (1981).
- [81] R. C. Leifin G. L. Wied, G. F. Bahr: Automated Cell Identification and Sorting. Academic Press, New York 1970, S. 131.
- [82] D. J. Arndt-Jovin, T. M. Jovin, J. Histochem. Cytochem. 22, 622 (1974).
- [83] V. Kachel, E. Glossner, E. Kordwig, G. Ruhenstroth-Bauer, J. Histochem. Cytochem. 25, 804 (1977).
- [84] U. Zimmermann, G. Pilwat, B. Esser, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 135 (1978).
- [85] G. Gregoriadis, A. C. Allison: Liposomes in Biological Systems. Wiley, Chichester 1980.
- [86] T. Ming Swi Chang: Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins. Vol. 1. Plenum Press, New York 1971, S. 147.
- [87] G. M. Ihler in G. Gregoriadis: Drug Carriers in Biology and Medicine. Academic Press, London 1979, S. 129.
- [88] K. Kinoshita, Jr., T. Y. Tsong, Nature 272, 258 (1978).
- [89] T. Nakamura, K. Konno, T. Moron, N. Tsuya, M. Hatano, J. Appl. Phys. 42, 1320 (1971).
- [90] D. S. Johnston, S. Saughera, M. Pons, D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta 602, 57 (1980).
- [91] H. Greenway, R. Munns, Annu. Rev. Plant Physiol. 31, 149 (1980).
- [92] I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, K. Yamamoto, I. Takato, F. Nishida in [1], S. 335.
- [93] J. Klein, Kontakte (Merck) 3, 29 (1980).
- [94] P. Brodelius, B. Dens, K. Mosbach, M. H. Zack, FEBS Lett. 103, 93 (1979).
- [95] M. Wada, J. Kato, I. Chibata, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 10, 275 (1980).