CH 668 984 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 668 984 A5

(51) Int. Cl.[4]: C 12 N 13/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 4063/86

(22) Anmeldungsdatum: 10.10.1986

(24) Patent erteilt: 15.02.1989

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.02.1989

(73) Inhaber:
Electropore, Inc., Boulder/CO (US)

(72) Erfinder:
Brodelius, Peter, Dr., Zürich
Shillito, Raymond Douglas, Dr., Chapel Hill/NC (US)
Potrykus, Ingo, Dr., Magden

(74) Vertreter:
Scheidegger, Zwicky, Werner & Co., Zürich

(54) Verfahren zur Gewinnung von Zellinhaltsstoffen.

(57) Es wird ein neuartiges Verfahren zur Gewinnung von Zellinhaltsstoffen aus Zellen beliebiger Herkunft beschrieben, in dessen Verlauf die Produzenten-Zellen Spannungs-Impulsen hoher elektrischer Feldstärke ausgesetzt werden, was zu einer Freisetzung von leicht isolierbaren Zellinhaltsstoffen unter Aufrechterhaltung der Zellstruktur führt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung von Zellinhaltsstoffen aus Zellen beliebiger Herkunft, unter Aufrechterhaltung der intakten Zellstruktur, dadurch gekennzeichnet, dass man besagte Zellen in einem geeigneten Inkubationsmedium mit elektrischen Spannungs-Impulsen hoher Intensität beaufschlagt und die in das Inkubationsmedium entlassenen Inhaltsstoffe isoliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Zellen um solche handelt, die sich in Kultur stabil erhalten oder vermehren lassen.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Zellen um Mikroorganismen-Zellen handelt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Mikroorganismen um Bakterien, Hefen oder mycelbildende Pilze handelt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Zellen um solche tierischer oder menschlicher Herkunft handelt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Zellen um solche pflanzlicher Herkunft handelt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Zellen um Zellinien von Thalictrum rugosum handelt.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Zellen um Zellinien von Chenopodium rubrum handelt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man Zellen beliebiger Herkunft in einem geeigneten Inkubationsmedium in einer Weise mit elektrischen Spannungsimpulsen beaufschlagt, dass besagte Zellen elektrischen Feldstärken zwischen 0.1 $kV \cdot cm^{-1}$ und 15 $kV \cdot cm^{-1}$ ausgesetzt sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Inkubation der Zellen in einem flüssigen Nährmedium erfolgt.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Zellen um immobilisierte Zellen handelt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Immobilisierung der Zellen mit Agarose oder Alginat erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man besagte Zellen mit 1 bis 10 elektrischen Spannungsimpulsen mit einer Repetitionsfrequenz zwischen 0.1 und 20 Sekunden beaufschlagt.

14. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Impulsbreite 1 Nanosekunde bis 1000 Mikrosekunden beträgt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem gewonnenen Zellinhaltsstoff um Berberin und/oder Betanin handelt.

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung von Zellinhaltsstoffen aus Zellen beliebiger Herkunft unter Aufrechterhaltung der intakten Zellstruktur.

Bereits seit den Anfängen der fermentativen Bearbeitung von Mikroorganismen sowie von pflanzlichen und tierischen Zellen besteht ein Interesse an der Freisetzung von Syntheseprodukten (z.B. Primär- oder Sekundärmetaboliten) aus der produzierenden Zelle. Mit der Entwicklung gentechnologischer Verfahren zur Manipulation von Mikroorganismen sowie tierischer und pflanzlicher Zellen, besteht in zunehmendem Masse ein Bedarf an verfeinerten und schonenden Isolationsmethoden.

Eine Vielzahl ökonomisch interessanter und wichtiger Zellinhaltsstoffe ist nicht in der Lage, die Zellmembranen zu passieren und wird normalerweise nicht an das umgebende Nährmedium abgegeben, sondern verbleibt innerhalb der Produzentenzelle. Dies gilt in erster Linie für makromolekulare Verbindungen, wie Polypeptide, Proteine, Polysaccaride und Nucleinsäuren. Aber auch niedermolekulare Syntheseprodukte, wie z.B. zahlreiche Metabolite des Sekundärstoffwechsels von Mikroorganismen, Pilzen und Pflanzen werden zum Teil in den produzierenden Geweben und Zellen abgelagert und sind folglich nicht ohne weiteres verfügbar.

In der pflanzlichen Zelle dient in erster Linie die Zellvakuole als Reservoir und Speicher für die verschiedensten Stoffwechselprodukte. Beispielhaft seien hier die in der Zellvakuole gelösten Farbstoffe, wie die Anthocyane und Anthoxanthine genannt. Daneben findet man aber auch Wirksubstanzen, die in der Human- und Tiermedizin oder der Naturheilkunde eine grosse Bedeutung erlangt haben oder erlangen könnten, wie z.B. verschiedene Glykoside (Digitalisglykosid), Alkaloide (Morphin) und viele andere mehr.

Zur Isolierung dieser Zellinhaltsstoffe musste bisher zunächst ein Zellaufschluss erfolgen, der meist nur unter Einsatz von grossem Zeit- und Arbeitsaufwand möglich ist und im allgemeinen zu einer Zerstörung der Zellen führt.

Da es sich bei biologischen Produkten in einer Vielzahl der Fälle um empfindliche Verbindungen handelt, deren strukturelle und funktionelle Integrität nur innerhalb eng begrenzter Milieubedingungen gewährleistet ist, kann die Aufarbeitung nur unter Anwendung entsprechend verfeinerter Methoden durchgeführt werden.

In der Regel werden bisher zwei verschiedene Verfahrensweisen angewendet.

Zum einen ist es möglich, die Zellen mit Hilfe mechanischer Manipulationen aufzubrechen, z.B. durch Vermahlen in Rührwerkskugelmühlen oder Kolloid-Mühlen, durch Anwendung von Druck und nachfolgende Entspannung (Homogenisator) sowie durch Ultraschallbehandlung. Eine andere Möglichkeit besteht in der Anwendung von thermischen, chemischen oder enzymatischen Methoden. Hierzu gehört beispielsweise die Trocknung und Lyophilisation der Zellen sowie die Behandlung der Zellen mit oberflächenaktiven Verbindungen (Detergentien) oder mit organischen Lösungsmitteln.

Diese bekannten Verfahrensweisen haben aber entscheidende Nachteile, da sie mit zeit- und arbeitsintensiven Aufarbeitungsschritten verbunden sind und im allgemeinen mit der Zerstörung der Zellen enden.

Im Falle der mechanischen Zerstörung der Zellstruktur müssen zunächst die anfallenden Zellwandtrümmer und andere zelluläre Bestandteile aus der Kulturlösung abgetrennt werden, bevor die weitere Aufarbeitung und Isolierung der gewünschten Zellinhaltsstoffe erfolgen kann.

Die Ultraschallbehandlung führt oft zu einer ungewollten und nachteiligen Erwärmung und zur unerwünschten Bildung freier Radikale, was zu unkontrollierbaren Reaktionen führen kann. Hinzu kommen hohe Energie- und Kostenaufwendungen.

Bei der Anwendung von Detergentien kann es andererseits zu unerwünschten Denaturierungen von Proteinen kommen. Darüber hinaus müssen die zugesetzten Chemikalien in der Regel zuerst wieder aus der Fermentationsbrühe entfernt werden, bevor die weitere Aufarbeitung erfolgen kann.

Die Verwendung von Enzymen ist im allgemeinen teuer und bleibt daher normalerweise auf den Labormassstab beschränkt. Auch in diesem Fall kann es zu unerwünschten Wechselwirkungen kommen, die die weitere Aufarbeitung erschweren.

Alle diese Nachteile können überraschenderweise durch die einfachen Massnahmen der vorliegenden Erfindung überwunden werden, insbesondere dadurch, dass bei Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens die Zellstruktur in dem Masse erhal-

ten bleibt, dass keine Zelltrümmer oder sonstige, die Aufarbeitung störende Zellbestandteile ins Kulturmedium gelangen.

In neuerer Zeit wurden Verfahren entwickelt, die es ermöglichen, Makromoleküle in Mikroorganismenzellen sowie in tierische und pflanzliche Zellen bzw. Protoplasten einzuschleusen, ohne deren Zellstruktur und damit die Lebensfähigkeit der Zellen nachhaltig zu beeinträchtigen.

Dabei ist es gelungen, die Membranpermeabilität von Protoplasten durch Behandlung mit elektrischen Impulsen zu erhöhen und somit einen Übertritt von Makromolekülen (z.B. DNA in Form von Plasmiden) aus dem Kulturmedium in die Protoplasten zu ermöglichen (Shillito, R.P. et al., (1985). Bio/Technology 3, 12, pp. 1099–1103).

Nun konnte überraschenderweise ein Verfahren entwickelt werden, das sich in Umkehrung der oben erwähnten Prinzipien nunmehr in hervorragender Weise für die Ausschleusung von Zellinhaltsstoffen aus Zellen unter Aufrechterhaltung der intakten Zellstruktur, eignet.

Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich somit um ein Verfahren zur Gewinnung von Zellinhaltsstoffen aus Zellen beliebiger Herkunft, unter Aufrechterhatlung der intakten Zellstruktur, das sich dadurch kennzeichnet, dass man besagte Zellen in einem geeigneten Inkubationsmedium mit elektrischen Spannungs-Impulsen hoher Intensität beaufschlagt und die in das Inkubationsmedium entlassenen Inhaltsstoffe isoliert.

Dabei werden zweckmässigerweise die Zellen zunächst in einem geeigneten Nährmedium über einen angemessenen Zeitraum hinweg kultiviert, anschliessend konzentriert und im gleichen oder jedem beliebigen anderen geeigneten Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine Elektroporator-Kammer zwischen zwei Elektroden eingebracht. Durch Entladung eines Kondensators über der Zellsuspension werden die Zellen kurzzeitig sehr hohen elektrischen Feldstärken ausgesetzt, was zu einer Freisetzung von Inhaltsstoffen aus dem Zellinneren in das umgebende Nährmedium führt. Die Isolierung der Zellinhaltsstoffe aus dem Kulturmedium erfolgt mit Hilfe an sich bekannter Methoden, wie z.B. durch Extraktion, durch Säulenchromatographie oder ähnliche Reinigungsverfahren.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann auch als kontinuierliches Verfahren angewendet werden, indem man die zellhaltige Suspension kontinuierlich und mit konstanter Geschwindigkeit zwischen den Kondensatorplatten hindurchbewegt und die Zellen kurzzeitig hohen elektrischen Feldstärken aussetzt.

Das erfindungsgemässe Verfahren eignet sich für die Gewinnung von Syntheseprodukten aus Zellen beliebiger Herkunft, die sich in Kultur stabil erhalten und vermehren lassen. Das Verfahren ist nicht auf bestimmte Zellen limitiert und beispielsweise auf Zellen von Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen und mycelbildende Pilze sowie Zellen oder Protoplasten menschlichen, tierischen und pflanzlichen Ursprungs gleichermassen anwendbar.

Besagte Zellen können auch in immobilisierter Form vorliegen.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens betrifft die Isolierung von Zellinhaltsstoffen aus Pflanzenzellen. Die Kultivierung der Pflanzenzellen erfolgt z.B. in einem für diesen Zweck geeigneten Nährmedium, z.B. in einem Medium nach Murashige und Skoog (Murashige T. and Skoog F., Physiol. Pl. 15, pp. 473–497, 1962), welches je nach dem gewünschten Stoffwechselprodukt in der entsprechenden Weise modifiziert werden kann.

Die Pflanzenzellen werden in einem der besagten Medien herangezogen und anschliessend zweckmässigerweise über ein Edelmetall-Sieb von grossen Zellaggregaten abgetrennt. Es folgen Zentrifugation und Resuspendierung der Zellen in einem identischen oder jedem beliebigen, für die Kultivierung von Pflanzenzellen geeigneten Kultur-Medium oder einem durch Zusatz eines geeigneten, die Zellen stabilisierenden Agens, modifizierten Kultur-Medium. Die so erhaltene Zellsuspension wird in eine zuvor z.B. mit Ethanol sterilisierte Elektroporator-Kammer eingebracht, wo die Zellen anschliessend durch Entladung eines Kondensators über der Zellsuspension kurzzeitig mit sehr hohen elektrischen Feldstärken beaufschlagt werden. In der Regel erfolgt eine drei- bis zehnmalige Entladung mit einer Repetitionsfrequenz zwischen 0.1 und 20 Sekunden, wobei die erreichten Feldstärken zwischen etwa 0.1 $kV \cdot cm^{-1}$ und etwa 15 $kV \cdot cm^{-1}$ betragen. Die für das erfindungsgemässe Verfahren benötigten Feldstärken sind abhängig von der Zellgrösse der verwendeten Zellen, wobei die Grösse der Zellen und die Feldstärke negativ korreliert sind. Die Impulsbreite liegt vorteilhafterweise im Bereich von 1 Nanosekunde bis 1000 Mikrosekunden.

Diese Behandlung der Zellen mit hohen Spannungs-Impulsen führt zur Freisetzung von Zellinhaltsstoffen, wie z.B. von in der Zellvakuole gelösten Farb- oder Wirkstoffen, in das die Zellen umgebende Kulturmedium ohne Zerstörung der Zellstruktur. Es hat sich gezeigt, dass sich das erfindungsgemässe Verfahren auch auf immobilisierte Zellen anwenden lässt, die z.B. in mit Agarose oder Alginat oder anderen Vernetzungsmitteln verfestigten Kulturmedien vorliegen.

Aber auch anderweitig immobilisierte Zellen können in dem erfindungsgemässen Verfahren eingesetzt werden.

Der ausserordentlich hohe Anteil an mit dem erfindungsgemässen Verfahren freigesetzter Substanz aus der Zelle kann mit Kontrollversuchen nachgewiesen werden, wobei als Kontrolle die Gewinnung der Zellinhaltsstoffe nach herkömmlichen Methoden, z.B. durch Extraktion, dient.

Die Lebensfähigkeit der Zellen nach der Anwendung der Elektroporation kann z.B. anhand des Wachstums der behandelten Zellen in frischem MS-Medium überprüft werden.

Die Freisetzung von Zellinhaltsstoffen aus den behandelten Zellen und deren Lebensfähigkeit korrelieren im allgemeinen miteinander. Hohe elektrische Feldstärken zwischen z.B. 8 $kV \cdot cm^{-1}$ und 15 $kV \cdot cm^{-1}$ führen zu einer quantitativen Freisetzung der Inhaltsstoffe aus der Zelle (Abb. 1), wobei jedoch die Vitalität der behandelten Zellen stark beeinträchtigt wird (Abb. 2). Hohe Überlebensraten der behandelten Zellen sind dagegen in der Regel mit geringeren Ausbeuten an Zellinhaltsstoffen verbunden. Eine Möglichkeit der Kompensation besteht im Zusatz von stabilisierenden Agenzien ins Inkubationsmedium, wodurch die Vitalität der Zellen auch bei relativ hohen Spannungswerten und daraus resultierend hohen Feldstärkewerten erhalten bleibt.

Im Gegensatz zu den Feldstärkewerten scheint der Einfluss der verwendeten Kapazitäten auf die Freisetzung der Zellinhaltsstoffe über einen weiten Bereich (10 nF – 40 nF) gering zu sein (Abb. 3).

Ein Zusammenhang zwischen der Vitalität der behandelten Zellen und den verwendeten Kapazitäten lässt sich nur bei niedrigen Feldstärken (1200 $V \cdot cm^{-1}$) feststellen, während bei hohen Werten (4800 $V \cdot cm^{-1}$) keine Korrelation zwischen beiden Parametern existiert (Abb. 4).

Wie die oben gemachten Ausführungen zeigen, ist es somit bei Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens möglich, je nach der vorliegenden Problemstellung, die experimentellen Parameter so zu wählen, dass man zu einem gewünschten Ergebnis gelangt, das heisst z.B. zu hohen Ausbeuten an synthetisierten Inhaltstoffen bei gleichzeitig verminderter Vitalität der behandelten Zellen oder aber zu hohen Überlebensraten bei etwas geringerer Ausbeute an Inhaltsstoffen.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung der vorliegenden Erfindung und haben keinen limitierenden Charakter.

In den nachfolgenden Beispielen und Abbildungen werden folgende Abkürzungen verwendet:

1 kV	1000 Volt
2.4 D	(2,4-Dichlorophenoxy)essigsäure
FG	Frischgewicht
Ms-Medium	Murashige and skoog's Medium

Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht/Volumen (Volumetrisches Gewicht)
w/w	Gewicht/Gewicht
s	Sekunde
h	Stunde
m	Minute

Beispiel 1

Freisetzung von Berberin aus Zellen einer Zellinie von Thalictrum rugosum

Berberin ist ein charakteristischer Inhaltsstoff der Berberidaceae und Ranunculaceae. Es handelt sich dabei um eine intensiv gelb gefärbte Verbindung, die chemisch gesehen zu den Benzylisochinolin-Alkaloiden gehört und in der Vakuole gelöst vorliegt.

Zellen einer Zellinie von Thalictrum rugosum werden über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg in einem Medium nach Murashige und Skoog (MS), dem zuvor 2.4 D in einer Konzentration von 2 µM zugesetzt wrude, bei einer Temperatur von 26 °C angezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einer Flüssig-Schüttelkultur (120 Upm) im Dunkel. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Zellsuspension durch ein Edelstahlsieb mit einer Maschenweite von 500 µm filtriert, um eventuell vorhandene grosse Zellaggregate abzutrennen.

Anschliessend werden die Zellen abzentrifugiert und in frischem MS-Medium resuspendiert. Um dabei eine einheitliche Zelldichte der für die Elektroporationsexperimente vorgesehenen Zellsuspensionen zu erreichen, weden die abzentrifugierten Zellen in einem Verhältnis (w/v) von 1:10 verdünnt (1 g Frischgewicht in 9 ml Medium).

Die Elektroporationsexperimente werden in einer Elektroporator-Kammer vom Dialog ® «Porator» (Dialog GmbH, Harffstrasse 34, 4000 Düsseldorf, Deutschland-West) durchgeführt.

Es handelt sich dabei um zylindrische Kammern mit einem Volumen von 0.35 ml und 1 ml. An den Kammerenden befinden sich Edelstahl-Elektroden mit einem Elektrodenabstand von 1 cm.

Vor dem Einbringen der Zellsuspension wird die Elektroporator-Kammer durch Waschen mit 70%igem und 100%igem Äthanol sterilisiert und anschliessend über einem sterilen Luftstrom aus einem Gebläse mit laminarer Luftströmung getrocknet.

0.30 ml oder 1 ml der oben erwähnten Zellsuspension werden dann in die Elektroporatorkammer überführt und hier 3 bis 10 mal einem elektrischen Impuls im Nano- bis Microsekundenbereich von 0.3 kV bis 15 kV, was einer elektrischen Feldstärke von 0.3 $kV \cdot cm^{-1}$ bis 15 $kV \cdot cm^{-1}$ entspricht, ausgesetzt. Der Abstand zwischen den einzelnen Impulsen beträgt dabei 10 s. Zur Erzeugung der elektrischen Feldimpulse werden Kondensatoren mit unterschiedlichen Kapazitäten verwendet, was zu unterschiedlichen exponentiellen Abkling-Konstanten der induzierten Impulse führt, die zwischen 5 bis 20 Mikrosekunden liegen.

Die Freisetzung des Vakuolenfarbstoffs Berberin aus Zellen von Thalictrum rugosum ins Kulturmedium wird mit Hilfe dünnschichtchromatographischer bzw. spektroskopischer Methoden ermittelt.

Die Menge an freigesetzter Substanz aus den Zellen wird in den Abbildungen in relativen Grössen im Vergleich zu Kontrollexperimenten angegeben. Bei den Kontrollen handelt es sich um Zellen, die unter gleichen Bedingungen angezogen werden, deren Farbstoff-Freisetzung aber unter Anwendung herkömmlicher Verfahren erreicht wird, wie z.B. durch Extraktion mit Methanol.

Beispiel 2

Freisetzung von Betanin aus Zellen einer Zellinie von Chenopodium rubrum

Beim Betanin handelt es sich um eine intensiv rot gefärbte Verbindung, die beispielsweise als Zellinhaltsstoff in roten Rüben zu finden ist. auch dieser Farbstoff, der chemisch gesehen als β-D-Glucopyranosid zu betrachten ist, liegt in der Vakuole gelöst vor.

Die Kultivierung der Zellen von Chenopodium rubrum erfolgt über einen Zeitraum von 3 Wochen in einem mit 2.4 D (2 µM) angereicherten MS-Medium als Flüssig-Schüttelkultur (80 Upm) unter Einhaltung eines Tag/Nacht-Rhythmus (16 h/8 h). die Inkubationstemperatur liegt auch in diesem Fall bei 26 °C.

Die Elektroporationsexperimente werden in analoger Weise zu den oben gemachten Angaben für Thalictrum rugosum durchgeführt.

Die Ermittlung der Menge an freigesetztem Betanin ins Kulturmedium erfolgt nach der Abtrennung der Zellen aus der Zellsuspension durch Zentrifugation aufgrund der Absorption der Kulturlösung bei 540 nm.

Beispiel 3

Freisetzung von Berberin aus immobilisierten Zellen von Thalictrum rugosum

Die Zellen einer Thalictrum rugosum Zellinie werden in MS-Medium unter Zusatz von 2.4 D über einen Zeitraum von 2 Wochen in einer Flüssig-Schüttelkultur (120 Upm) bei einer Temperatur von 26 °C im Dunkeln kultiviert, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die Zellsuspension wird dann zunächst zur Abtrennung eventuell vorhandener Zellagglomerate filtriert, anschliessend werden die Zellen abzentrifugiert und in einem w/v-Verhältnis von 1:10 in frischem MS-Medium resuspendiert (1 g Zellen (FG)/9 ml MS-Medium).

Zur Herstellung von immobilisierten Zellen wird dem Kulturmedium Agarose (z.B. Sigma Typ VII) bis zu einer Konzentration von 4% (w/w) bei einer Temperatur von 37 °C zugesetzt.

Dieser Ansatz wird dann unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer mit 40 ml Soja-Öl gleicher Temperatur vermischt. Nach Bildung von Tröpfchen mit einem Durchmesser von 0.5 mm – 1 mm erfolgt die Abkühlung der Mixtur auf 10 °C. Es entstehen auf diese Weise Agarose-Kügelchen, in denen die Zellen eingeschlossen vorliegen. Diese Agarose-Kügelchen werden gesammelt und durch mehrmaliges Waschen mit MS-Medium von anhängenden Ölresten befreit.

Die auf die oben beschriebene Weise immobilisierten Zellen werden dann in analoger Weise zu den suspendierten, freien Zellen für die Elektroporations-Experimente verwendet. In diesem Fall werden die immobilisierten Zellen in der 1-ml-Elektroporationskammer mit Spannungs-Impulsen mit einer exponentiellen Abklingkonstanten von 10 Mikrosekunden beaufschlagt.

Beispiel 4

Freisetzung von Berberine aus immobilisierten Zellen von Thalictrum rugosum

Die Kultivierung der Zellen von Thalictrum rugosum wird in gleicher Weise wie in Beispiel 1 durchgeführt.

Zur Herstellung der immobilisierten Zellen wird in diesem Fall Alginat verwendet. Dabei werden die filtrierten und abzentrifugierten Zellen in alginat-haltigem Ms-Medium (z.B. 2% w/w, Portan HF) bei Zimmertemperatur in einem Verhältnis von 1:10 resuspendiert (1 g Zellen (FG)/9 ml MS-Medium).

Die Zellsuspension wird anschliessend tröpfchenweise in MS-Medium, das einen Anteil von 50 mM $CaCl_2$ enthält zugegeben. Es bilden sich Kügelchen, die weitere 30 Minuten gerührt werden, bevor sie mehrmals mit frischem MS-Medium, enthaltend 5 mM $CaCl_2$, gewaschen und separiert werden.

Auch in diesem Fall erfolgt die Durchführung der Elektroporationsexperimente in gleicher Weise wie zuvor in Beispiel 4 für die Zellen in Suspensionskultur beschrieben.

Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche beweisen, dass bei Wahl geeigneter Parameter eine quantitative Freisetzung von Zellinhaltsstoffen aus den Vakuolen erreicht wird (Abb. 1 und 3),

unabhängig davon, ob die verwendeten Zellen in Suspension oder in Form immobilisierter Zellen vorliegen. (Abb. 5).

Es besteht eine eindeutige Abhängigkeit der Freisetzung der Vakuolenfarbstoffe von der elektrischen Feldstärke. In einem Bereich zwischen 1 $kV \cdot cm^{-1}$ und 4 $kV \cdot cm^{-1}$ ist ein starker Anstieg der Freisetzung zu beobachten, die bei Werten von 8 $kV \cdot cm^{-1}$ bzw. 15 $kV \cdot cm^{-1}$ (Chenopodium rubrum) quantitativ erfolgt. (Abb. 1).

Die Kapaziät des verwendeten Kondensators hat dagegen offenbar nur geringe Bedeutung für die Menge an freigesetzter Substanz.

Die Schwankungen in den Freisetzungsraten über den verwendeten Kapazitätsberich (10 nF – 40 nF) hinweg sind nur gering (Abb. 3). Es zeigt sich, dass auch in diesem Fall hohe Feldstärken (4800 $V \cdot cm^{-1}$) zu hohen Freisetzungsraten (bis 100%) führen, während bei niedriger elektrischer Feldstärke (1200 $V \cdot cm^{-1}$) die Werte entsprechend geringer ausfallen (ca. 25%).

Auch die Anzahl der abgegebenen Spannungsimpulse spielt für die Freisetzung der Farbstoffe offenbar nur eine untergeordnete Rolle. Wie die Abbildung 6 am Beispiel der Berberin-Freisetzung zeigt, verlaufen die Kurven für 3 bzw. 10 Impulsgaben praktisch parallel.

Im Gegensatz zur Farbstoff-Freisetzung aus der Vakuole nimmt die Lebensfähigkeit der Zellen nach der Elektroporation mit zunehmender Feldstärke ab.

Wie am Beispiel von Thalictrum rugosum gezeigt (Abb. 2), ist in einem Bereich zwischen 600 $V \cdot cm^{-1}$ und 2400 $V \cdot cm^{-1}$ eine starke Abnahme an lebensfähigen Zellen zu beobachten.

Auch die verwendete Kapazität hat in diesem Fall einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen, vornehmlich im unteren Feldstärke-Bereich (1200 $V \cdot cm^{-1}$. Diese nimmt bei Werten zwischen 10 nF–40 nF deutlich ab. Dagegen bleibt sie bei einer elektrischen Feldstärke von 4800 $V \cdot cm^{-1}$ praktisch unverändert (Abb. 4).

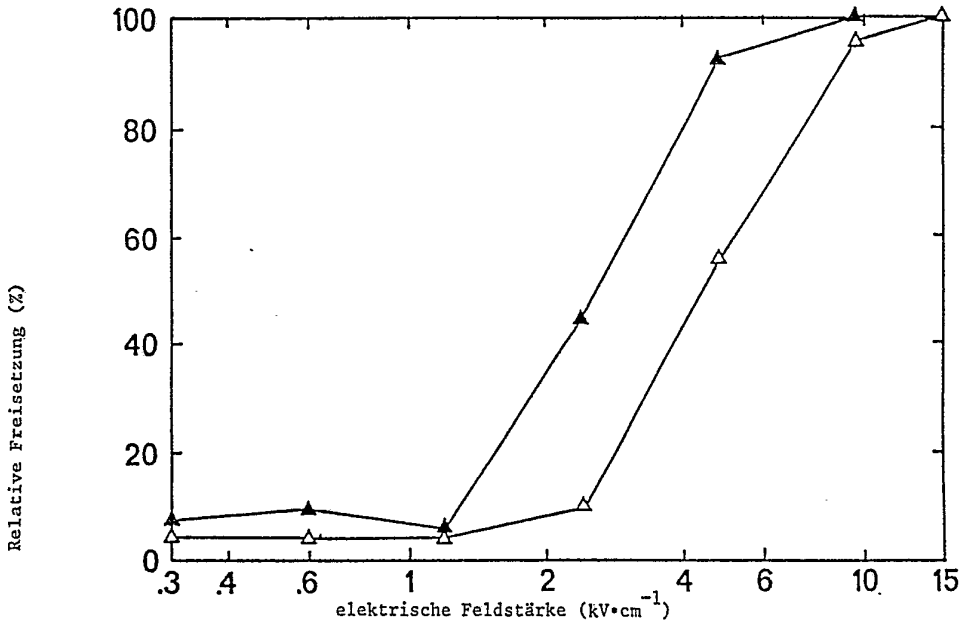


Abb. 1: Relative Freisetzung von Berberin (▲) und Betanin (△) in Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke

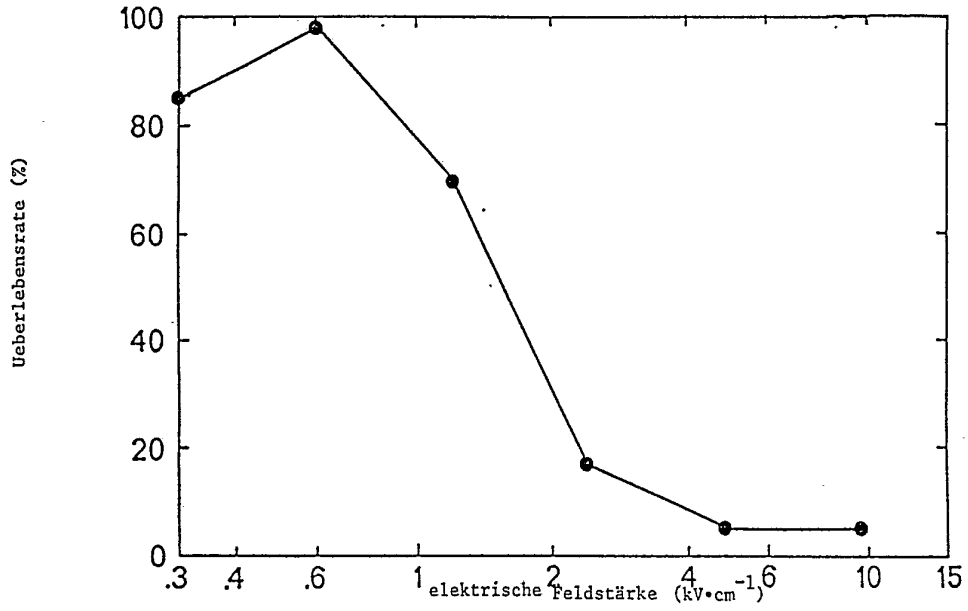


Abb. 2: Abhängigkeit der Vitalität einer Zellininie von Thalictrum rugosum von der elektrische Feldstärke

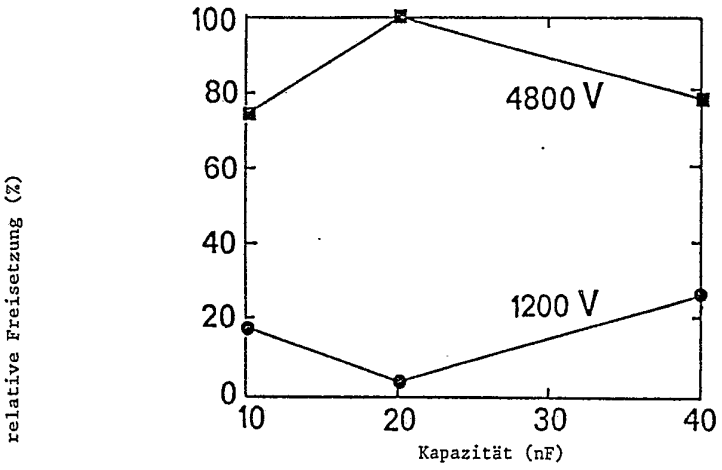


Abb. 3: Relative Freisetzung von Berberin in Abhängigkeit von der Kondensator-Kapazität

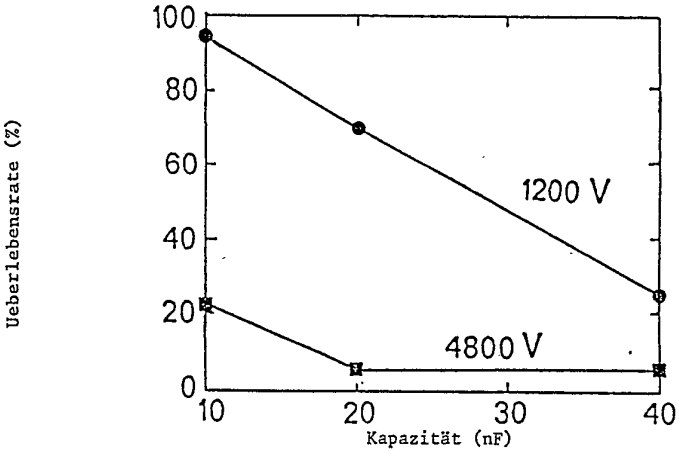


Abb. 4: Abhängigkeit der Vitalität einer Zellinie von Thalictrum rugosum von der Kondensator-Kapazität

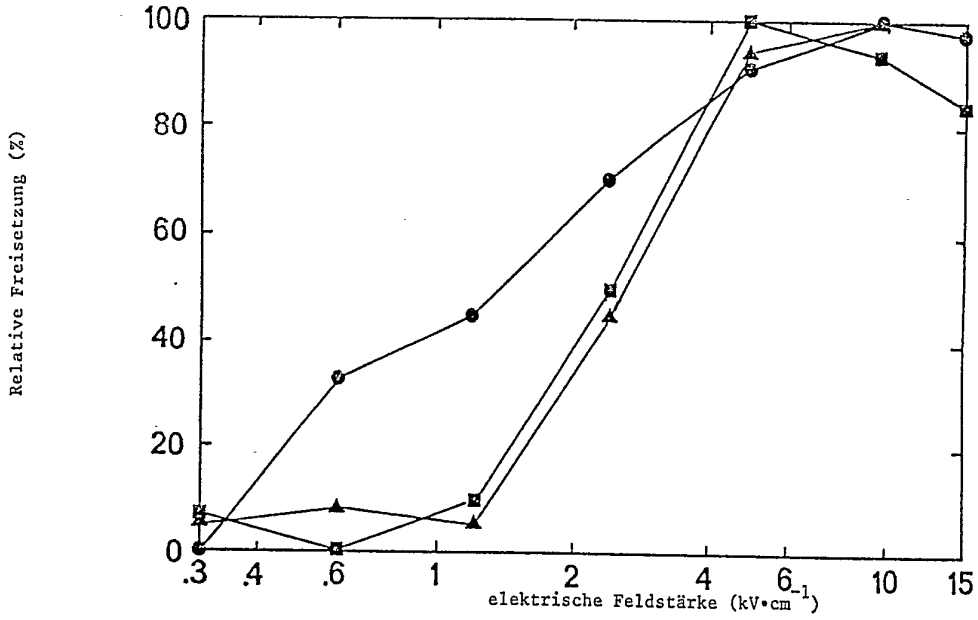


Abb. 5: Relative Freisetzung von Betanin aus freien Zellen (▲) mit Agarose immobilisierten Zellen (▣) und aus mit Alginat immobilisierten Zellen (●) einer Zellinie von Thalictrum rugosum

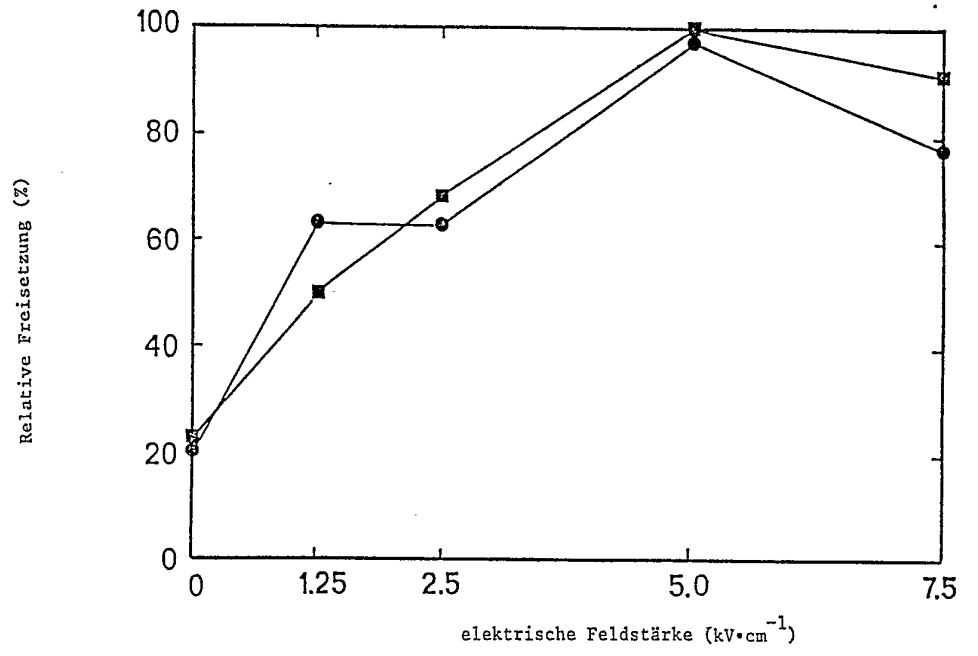


Abb. 6: Relative Freisetzung von Betanin aus Zellen einer Zellinie von Thalictrum rugosum in Abhängigkeit von der Impulshäufigkeit [3 Impulse (▣), 10 Impulse (●)]