Katja Trontelj[1], Marko Ušaj[2], Vladka Čurin Šerbec[3], Damijan Miklavčič[4]

Zlivanje celic z elektrofuzijo

Cell Electrofusion

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: celična fuzija, elektrofuzija, elektroporacija, hibridomna tehnologija

Članek prikazuje pojav zlivanja celic, pomen tega pojava pri nekaterih življenjsko pomembnih procesih in uporabo elektromagnetnega polja pri kontroliranem zlivanju. Zlivanje celic je pojav, ki ga živi organizmi uporabljajo med razvojem in za regeneracijo tkiv. Ta v živih organizmih poteka specifično, njena vloga je vnaprej določena, vodijo pa jo različni proteini in proteinski kompleksi. Sposobnost membran, da se zlivajo nespecifično zaradi zunanjega povzročitelja, kot je npr. električno polje, pa je pomembna za biotehnologijo, medicino in raziskave v biologiji. Omogoča nam pridobivanje zelo uporabnih hibridnih celic in njihovih produktov, kot so monoklonska protitelesa, ter študij osnovnih mehanizmov zlivanja. Elektrofuzija je učinkovita nevirusna in nekemična metoda zlivanja celic, pri kateri celične membrane, ki jih želimo zlivati, destabiliziramo s kratkimi visokonapetostnimi električnimi pulzi. Optimalne vrednosti električnih parametrov za zlivanje je treba določiti za vsako vrsto celic posebej. Poleg destabilizacije membrane z električnim poljem je treba zagotoviti stik med celicami. V raziskovalne namene se delež zlitih celic (izplen zlivanja) najpogosteje ovrednoti s pomočjo fluorescentnih citoplazemskih barvil. Pri hibridomni tehnologiji pa s selektivnimi mediji in izbiro primernih mielomskih celic ohranimo samo zlite celice – hibridome. Izplen hibridomov pa je mnogo manjši od izplena dvojno obarvanih zlitih celic, saj pri hibridomni tehnologiji zaznamo samo tiste zlite celice, ki so preživele in se uspešno delijo.

ABSTRACT

KEY WORDS: cell to cell fusion, electrofusion, electroporation, hybridoma technology

This paper describes the phenomena of cell fusion: it's importance in life processes and the use of electromagnetic field in induced electrofusion. Cell fusion is a common phenomenon in the living organisms during development and later for tissue regeneration. In living organisms cell fusion is specific; regulated by different specialized fusion proteins and protein complexes. The ability of membranes to fuse nonspecifically, induced by an external influence, such as an electric field is, however, important for biotechnology, medicine and research in biology. It enables us to produce very useful hybrid cells and their products – monoclonal antibodies, and to study basic mechanisms of cell fusion. Electrofusion is an efficient non

[1] Mag. Katja Trontelj, univ. dipl. kem., Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana; katja.trontelj@fe.uni-lj.si

[2] Marko Ušaj, univ. dipl. inž. el., Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana

[3] Prof. dr. Vladka Čurin Šerbec, univ. dipl. kem., Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana; Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 5, 1000 Ljubljana

[4] Prof. dr. Damijan Miklavčič, univ. dipl. inž. el., Laboratorij za biokibernetiko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, 1000 Ljubljana

viral and non chemical method for cell fusion, where cell membranes are destabilized by means of short, high voltage electric pulses. Optimal values of electrical parameters for fusion have to be determined for each cell line. Besides cell membrane destabilization, contact between cells should be achieved. In research, fusion yield is most often determined via fluorescent cell tracker dyes. In hybridoma technology selection media and appropriate mieloma cells are used, so that only hybrid cells survive. Hybridoma yield is, however, much smaller then fusion yield detected by means of fluorescent dyes since only fused cells that survive and proliferate are detected.

UVOD – FUZIJA V BIOLOŠKIH SISTEMIH

Fuzija membran zagotavlja specifičen in kontroliran prenos molekul iz celic ali vanje ter združevanje posameznih celic v življenjskih procesih. V bioloških sistemih je zelo pogosta in poteka specifično, usmerjajo jo specializirani proteini *(1)*. Zlivajo se celice med seboj, pri eksocitozi se celične membrane zlivajo z znotrajceličnimi organeli. Pri okužbi z virusom pa se celične membrane zlivajo z virusno membrano. S fuzijo se začne življenje, pogosta pa je tudi kasneje pri razvoju in obnavljanju tkiv; med drugim mišic, kosti, posteljice, očesne leče in epidermisa. Opazili so jo tudi pri transplantaciji kostnega mozga *(2)*.

Proteini, ki vodijo fuzijo pri različnih tipih celic, so si med seboj različni. Fuzijski proteini s svojimi konformacijami preuredijo strukturo lipidnega dvosloja in s tem usmerjajo proces fuzije. Identifikacija teh proteinov ali proteinskih kompleksov (fuzogenov) in mehanizmov njihovega delovanja v različnih primerih pa je tema današnjih raziskav *(3)*. Najbolj poznani proteini zlivanja celic so proteini Env HIV, HA influenca in SNARES. Med pomembnejšimi proteini zlivanja pa so še t. i. »oblikovalci membran«, ki določajo ukrivljenost membrane. Le-ta je namreč pomemben dejavnik pri zlivanju membran, saj naredi membrano fuzogeno (sposobno zlivanja), približa lipidne dvosloje ter zagotovi, da fuzija poteče do konca in končni produkt procesa ni hemifuzija (vmesno stanje, v katerem sta zlita samo monosloja v stiku, ne pa tudi oddaljena monosloja obeh lipidnih dvoslojev). Ti proteini pogosto vsebujejo domene v obliki zagozd, domene BAR (v obliki banane različnih ukrivljenosti) ali domene C2 (npr. sinaptotagmini), ki povzročijo lokalno povečano ukrivljenost membrane in odstranitev proteinov, ki zaradi ukrivljenosti ne morejo obstati na tem delu membrane. Proteini, ki preoblikujejo membrano, torej premagajo energijsko bariero za zlivanje lipidnih dvoslojev, rečemo lahko, da pri zlivanju igrajo vlogo katalizatorjev *(4, 5)*. Potek zlivanja v bioloških sistemih je zelo podoben zlivanju lipidnih dvoslojev, v katerih ni nobenih proteinov. Zlivanje lipidnih dvoslojev najbolje opiše model, ki poteka preko začetnega hemifuzijskega intermediata. Iz njega nastane majhna fuzijska pora, ki se nato povečuje do končnega zlitja dveh membran *(6)*.

UPORABA FUZIJE V BIOTEHNOLOGIJI IN MEDICINI

Celična fuzija v bioloških sistemih večinoma poteka specifično, vodijo jo specializirani proteini. Sposobnost membran, da se zlivajo nespecifično zaradi zunanjega povzročitelja, kot je npr. električno polje, pa je pomembna za biotehnologijo, medicino in raziskave v biologiji. Omogoča nam pridobivanje zelo uporabnih hibridnih celic in njihovih produktov, kot so monoklonska protitelesa, ter študij osnovnih mehanizmov fuzije.

Postopek za pridobivanje klonske populacije celic (hibridomov), ki izločajo protitelesa definirane specifičnosti, sta že leta 1975 razvila Koehler in Milstein in za to leta 1984 prejela Nobelovo nagrado za medicino *(7)*. Bistvo njune »hibridomne tehnologije« je zlivanje limfocitov B, ki proizvajajo protitelesa, z mielomskimi celicami, ki jih lahko gojimo v pogojih *in vitro*. Hibridomi tako rastejo

v pogojih *in vitro*, kjer proizvajajo protitelesa definirane specifičnosti, t. i. monoklonska protitelesa.

Naslednja zelo aktualna uporaba zlivanja celic je priprava hibridnih celičnih cepiv za imunoterapijo pri rakavih obolenjih *(8)*. Tumorske celice imajo raznovrstne in nepredvidljive napake, ki onemogočajo delovanje imunskega sistema. Pogosto je zmanjšano izražanje antigenov na površini celic *(9)*. Pri imunoterapiji raka zmanjšano izražanje antigenov nadomestijo z uporabo dendritskih celic, ki imajo največjo moč predstavljanja antigenov v imunskem sistemu. Zaradi sposobnosti zelo gibljivih dendritskih celic, da prenesejo antigen do sekundarnih limfatičnih organov in aktivirajo efektorske celice T, pa so idealne za indukcijo specifične antitumorske imunosti *(10)*. Antigene lahko v dendritske celice vnesemo na različne načine. Eden od načinov vnosa je zlivanje dendritskih celic s tumorskimi. Hibridne celice, ki jih pridobimo na ta način, povzročajo imunost proti vsem tumorskim antigenom, vključno s tistimi, ki jih ne poznamo. Za uporabo hibridnega celičnega cepiva pri ljudeh je treba zagotoviti hiter in učinkovit postopek za terapijo, preden bolezen začne napredovati. V ta namen je treba v kratkem času pripraviti dovolj velike količine hibridnih celic, zato potrebujemo učinkovit protokol za zlivanje celic.

Pred nekaj leti se je pokazalo, da se tudi pri obnavljanju tkiv s celično terapijo pojavi mehanizem zlivanja celic. Pri transplantaciji izvornih celic enega tipa tkiva te celice pod ustreznimi pogoji ustvarijo tkivo drugega tipa, prisotnega na mestu transplantacije. V nekaterih primerih so raziskovalci to sposobnost celic poimenovali plastičnost izvornih celic in jo uspešno razložili kot dediferenciacijo in ponovno diferenciacijo celic v tip tkiva, ki je prisoten v njihovi okolici *(11)*. V nekaj dobro opisanih primerih zlivanja transplantiranih celic, ki izvirajo iz kostnega mozga, s hepatociti v jetrih, z nevroni v možganih in s celicami srčne mišice pa so dokazali, da je vzrok spremembe razvojne usode transplantiranih celic izključno celično zlivanje *(2, 12, 13)*. To spoznanje predstavlja možnost za usmerjeno celično terapijo z namenom obnavljanja organov. V primerjavi z virusnimi in kemijskimi metodami so električni pulzi uporabni tudi v pogojih *in vivo*. Obstaja pa tudi možnost zlivanja v pogojih *ex vivo*.

Zlivanje celic je prav tako uporabna metoda za vnos receptorjev v celično membrano ciljne celice, kar omogoča študij njihove strukture in biološke vloge. Osnovni princip je zlitje človeških celic, ki vsebujejo receptor za določeni patogen, neposredno z epitelnim tkivom anestezirane živali. Žival je zaradi vnesenega receptorja dovzetna za okužbo, zato lahko služi kot model za proučevanje humanih okužb *(14)*.

Zlite celice so primerne tudi za študij elektrofizioloških lastnosti celic. Pri proučevanju t. i. »celic velikank«, ki so jih pripravili z zlitjem mnogih celic in dosegajo premere tudi več kot 50 μm, se je pokazalo, da imajo te praktično enako membransko kapacitivnost in prevodnost na enoto površine kot starševske celice normalne velikosti. V celici velikanki je zaradi močno povečane površine membrane tudi močno povečano skupno število ionskih prenašalcev. Celice velikanke so zaradi tega idealne za proučevanje tistih ionskih prenašalcev, ki se jih na nivoju ene same starševske celice zaradi njihovega majhnega števila in posledično nemerljivo nizkih amplitud električnega toka ne da opazovati *(15)*.

Elektrofuzija

Že leta 1961 so ugotovili, da se pod določenimi pogoji zlivajo somatske celice *in vitro*. Spontano zlivanje somatskih celic so prvič dokazali, ko so identificirali celice z mešanimi kariotipi po skupnem gojenju različnih celičnih linij v kulturi *(16)*. V zgodnjih sedemdesetih letih so uvedli viruse in polietilen glikol kot agensa za zlivanje protoplastov in živalskih celic. V poznih sedemdesetih letih pa so prvič poročali o fuziji, ki jo je povzročilo zunanje električno polje, torej o elektrofuziji *(17)*. Pri z zunanjimi vplivi induciranem zlitju nastanejo hibridne hčerinske celice, ki nosijo oba nabora starševskih kromosomov v enem jedru. Za večino celic je to pogubno, iz nekaterih hibridnih celic pa lahko po naslednjih celičnih delitvah nastane stabilna celična linija z naborom kromosomov, ki ji omogoča preživetje in je sestavljen iz kromosomov obeh starševskih celic *(18)*.

Izkazalo se je, da lahko električno polje povzroči zlivanje zelo različnih celičnih in

modelnih membran (lipidnih dvoslojev, liposomov ipd.). Sklepali so, da so za zlivanje pomembne lastnosti membran, ki so neodvisne od tipa posamezne membrane. Membrane so normalno stabilne strukture, odporne na zunanje razmere, zato je za zlivanje potrebna destabilizacija, to je sprememba molekularne strukture membrane v tako, ki je ugodna za zlivanje. Poleg tega pa je treba zagotoviti še stik med membranami, ki bo omogočil zlitje njihovih lipidnih dvoslojev *(19)*.

Destabilizacija membrane

Pri elektrofuziji destabilizacijo membrane dosežemo z elektroporacijo. To pomeni, da z uporabo kratkih, visokonapetostnih električnih pulzov v celični plazemski membrani povzročimo nastanek hidrofilnih por. Le-te so lahko reverzibilne in se po določenem času zaprejo (angl. *resealing*), pri nadkritični membranski napetosti pa pride do ireverzibilne porušitve, ko se membrana ne more več zaceliti in celica propade *(20)*.

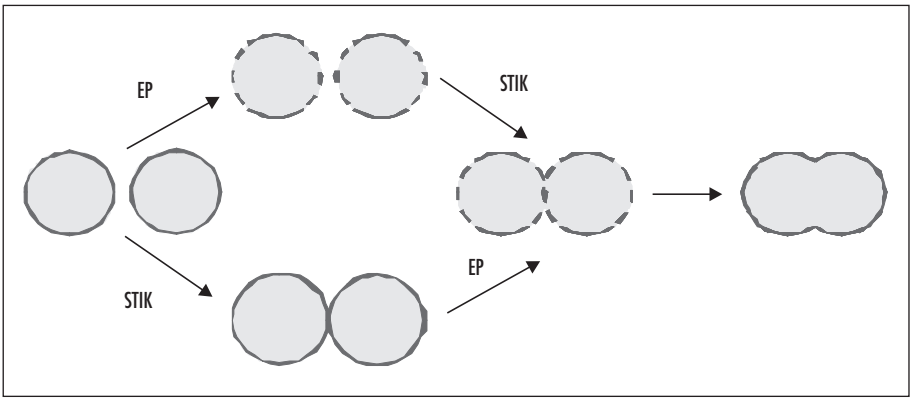
Poenostavljeno lahko rečemo, da je z elektroporacijo destabilizirana membrana tudi fuzogena (sposobna zlivanja). Velikost transmembranske napetosti, ki je potrebna za zlivanje, je namreč približno enaka kot tista, ki je potrebna za elektroporacijo. Poleg tega sta elektroporacija in elektrofuzija podobno funkcijsko odvisni tudi od drugih električnih parametrov, kot so število pulzov, čas trajanja pulza in smer električnega polja *(21–23)*.

Stik med celicami

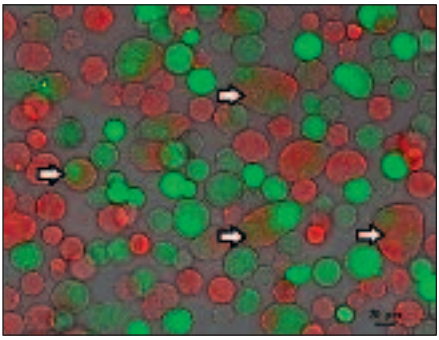
Do zlivanja celic seveda pride le, ko so njihove destabilizirane membrane dovolj blizu skupaj. Celice se normalno ne približujejo druga drugi na razdaljo, ki bi bila dovolj majhna za fuzijo (≈ 1 nm). Zaradi negativnega naboja, ki ga ima večina celic na svoji površini, se namreč medsebojno odbijajo. To odbojno silo je treba premagati, če želimo, da se celice dovolj približajo, da lahko pride do mešanja lipidnih molekul iz različnih membran. Vzpostavitev fuzogenega stanja membrane z elektroporacijo in zagotovitev stika med celicami sta torej dva nujna dela procesa zlivanja celic. Proces so uspešno izvedli v obeh možnih zaporedjih teh dveh delov, to je v t. i. protokolih PF (angl. *pulse first*) in CF (angl. *contact first*) (slika 1).

Stik med celicami lahko vzpostavimo na različne načine. Tekom let so poskušali s številnimi metodami: od valjanja celic v plastičnih posodah, uporabe posebnih mehanskih komor do uporabe podtlaka in filtrov *(24–26)*. Uporaba vseh naštetih metod se ni uveljavila. Uporabljali so tudi metodo medsebojne vezave celic s pomočjo avidin-biotinskega mostu, ki pa je specifična in draga ter ravno tako ni dosegla široke uporabe *(27)*.

Najpogosteje se uporablja dielektroforeza, pri kateri celice z uporabo nehomogenega izmeničnega električnega polja nizkih jakosti uredimo v verižice (angl. *pearl chains*). Trenutno vsi komercialno dosegljivi sistemi za elektrofuzijo delujejo na tem principu. Ta



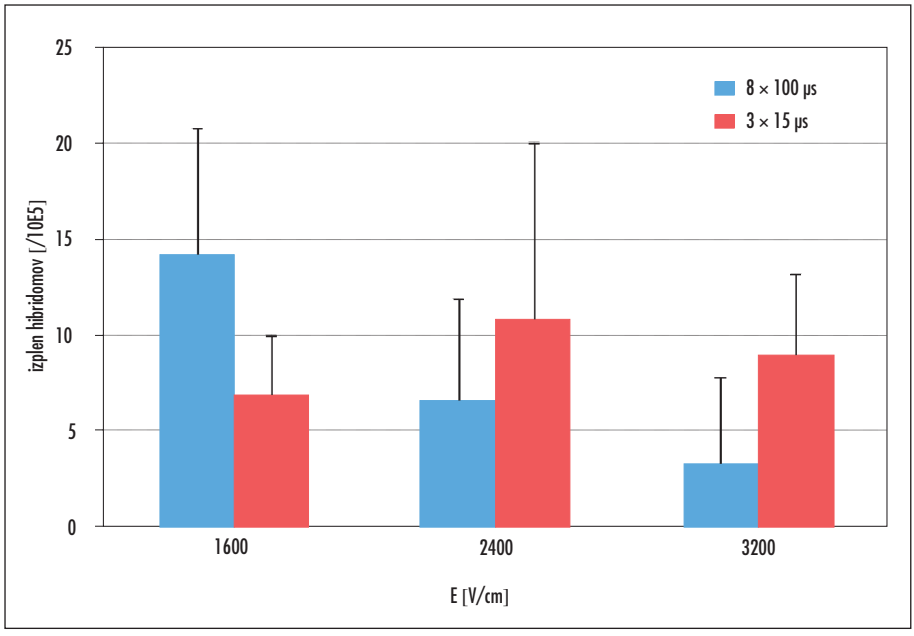
Slika 1. *Dve zaporedji izvedbe zlivanja celic z elektrofuzijo; najprej elektroporacija (EP) in nato stik (zgornja shema) ter najprej stik in potem EP (spodnja shema).*



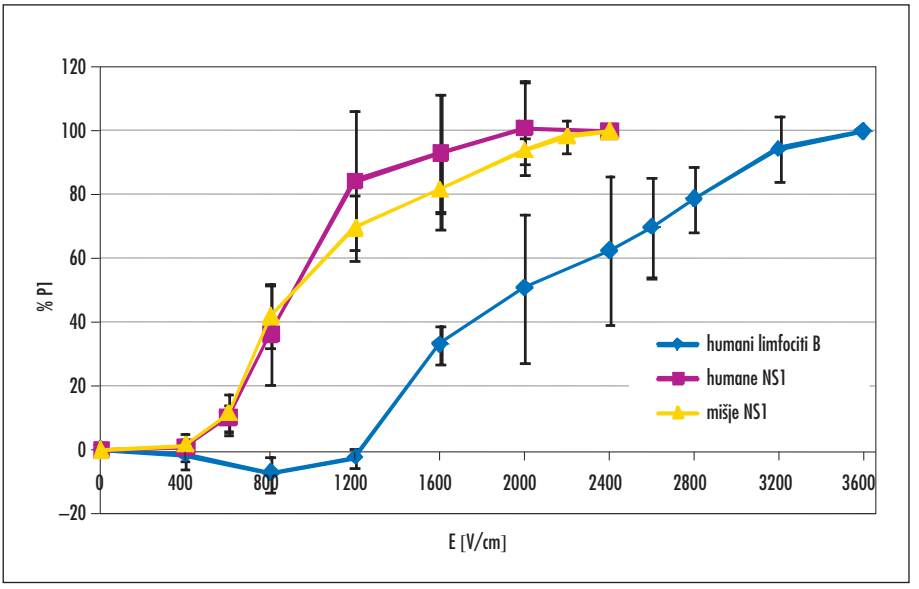
Slika 2. *Tipična trikanalna slika celic B16F1 po elektrofuziji: celice so pred elektrofuzijo obarvane s fluorescentnima barviloma – polovica celic z zelenim (CMFDA) in druga polovica z rdečim (CMRA). Trikanalna mikroskopska slika je sestavljena iz treh slik (fazni kontrast, fluorescenca CMRA– oranžna (vzbujanje pri 548 nm) in fluorescenca CMFDA– zelena (vzbujanje pri 492 nm), 20-kratna povečava (31). Fluorescentni sliki prispevata rdečo oziroma zeleno barvo, fazni kontrast pa sivo sliko celic, na kateri so jasno vidne njihove membrane, kar omogoča nedvoumno prepoznavanje dvobarvnih celic (puščice). Za zagotavljanje stika med celicami je bila uporabljena modificirana metoda pritrjevanja.*

metoda zahteva uporabo pufrov nizkih prevodnosti in povzroči segrevanje suspenzije, kar ni ugodno za celice *(24)*. Po drugi strani pa omogoča razvoj posebnih komor – mikročipov, tudi pretočnih, ki bodo omogočali avtomatizacijo in pospešitev procesa *(28, 29)*.

Pri zlivanju celic, ki so pritrjene na podlago in so konfluentne, je stik med njimi spontan *(30)*. V tem primeru pri fuziji pogosto nastanejo mnogojedrne celice; to pomeni, da se veliko celic zlije v eno samo. Take celice pa redko preživijo in se delijo, zato ta metoda večinoma ni primerna. Obetavne rezultate po drugi strani daje modificirana metoda pritrjevanja, kjer celice gosto nasadimo in pustimo zelo kratek čas (od 20 minut do nekaj ur, odvisno od vrste celic). V tem času se pritrdijo na podlago dovolj močno, da lahko zamenjamo pufer in izvedemo elektroporacijo, a ohranijo sferično obliko *(31)*. S to metodo večinoma dobimo celice, ki imajo malo (od dve do pet) jeder in so zato v mnogo večji meri sposobne proliferacije (slika 2).



Slika 3. *Izplen hibridomov, nastalih iz mišjih celic NS1 in primarnih humanih limfocitov B iz periferne krvi. Izplen je definiran kot število hibridomov, ki so nastali, deljeno s številom limfocitov B, ki smo jih uporabili. Rezultati so povprečje treh do petih poskusov. Modri stolpci predstavljajo poskuse, kjer smo uporabili 8 pulzov z dolžino 100 µs, rdeči pa poskuse, kjer smo uporabili 3 pulze z dolžino 15 µs (neobjavljeni rezultati).*



Slika 4. *Krivulje odvisnosti intenzitete elektroporacije od amplitude električnega polja za tri različne vrste celic: za humane celične linije huNS1 (r = 5,25 µm), mišje celične linije moNS1 (r = 7,75 µm) in primarne humane limfocite B iz periferne krvi (r = 3,6 µm). Intenziteta elektroporacije je podana kot relativna intenziteta fluorescence propidijevega jodida (neobjavljeni rezultati). Propidijev jodid je fluorescentno barvilo, ki ne more skozi nepoškodovano membrano. Če mu z elektroporacijo omogočimo, da pride v celico, se v njej veže na DNA. Vezan na DNA fluorescira svetlobo v območju valovnih dolžin 430–570 nm (34). Povečanje deleža celic, obarvanih s propidijevim jodidom, zato predstavlja delež celic, ki so bile uspešno elektroporirane.*

Modificirana metoda pritrjevanja je primerna za celice, ki rastejo pritrjene in se tudi v kratkem času dovolj močno pritrdijo na podlago. Slabše rezultate pa dobimo s to metodo pri suspenzijskih celicah, ki se le rahlo pritrdijo (usedejo) in se premaknejo že zaradi aplikacije električnih pulzov. Kljub temu smo s to metodo uspeli pripraviti hibridome med suspenzijskimi mielomskimi celicami NS1 in humanimi limfociti (slika 3).

Pri vseh zgoraj naštetih metodah so celice že v stiku, ko jih izpostavimo električnim pulzom. Način, s katerim lahko zagotovimo stik med celicami po elektroporaciji, pa je centrifugiranje celic *(32, 33)*. To zaporedje postopka elektrofuzije (angl. *contact first*) načeloma dopušča obdelavo vsake od dveh vrst partnerskih celic z različnimi električnimi pulzi. Posebej je to uporabno, ko želimo med seboj zlivati celice, ki za optimalno sposobnost zlivanja potrebujejo obdelavo z različnimi električnimi pulzi. Celične membrane moramo z elektroporacijo reverzibilno destabilizirati, tako da se membrane zacelijo (okrevajo) in celice preživijo. Optimalne vrednosti električnih parametrov, s katerimi dosežemo reverzibilno elektroporacijo oziroma sposobnost zlivanja, pa so odvisne od velikosti celic in od bioloških lastnosti posameznih vrst celic ter so zato za različne vrste celic različne (slika 4) *(20)*.

Če vzpostavljamo stik med celicami z že destabiliziranimi membranami, je pomembno, da to storimo v čim krajšem času po elektroporaciji pri nizki temperaturi, ko so celične membrane še sposobne zlivanja. Ta čas je reda velikosti sekund do minut in je med drugim odvisen od intenzivnosti električnih pulzov in temperature *(35)*.

Ovrednotenje izplena zlitih celic

Za zaznavanje in ovrednotenje izplena zlivanja celic se večinoma uporablja dvojno barvanje s fluorescentnimi barvili (slika 2). Izplen zlivanja se v tem primeru podaja kot delež

dvojno obarvanih celic. Le-tega lahko določimo s štetjem zlitih in nezlitih celic pod mikroskopom ali s pretočnim citometrom. Pri slednjem se je treba zavedati, da dobimo nekoliko višje vrednosti zaradi celičnih skupkov, ki jih meritev prepozna kot zlite celice *(25, 36)*.

Pri hibridomni tehnologiji izplen zlivanja predstavlja število hibridomov, nastalih iz limfocitov B in partnerskih mielomskih celic, ki so preživeli ter se uspešno delijo. Delež pridobljenih hibridomov je zato bistveno nižji kot delež dvojno obarvanih celic.

ZAKLJUČEK

Zaradi velike uporabnosti zlitih celic in njihovih produktov v biologiji in medicini se je veliko znanstvenikov posvetilo optimizaciji protokola elektrozlivanja celic. Elektrozlivanje celic je varna metoda, saj ne vključuje uporabe kemikalij ali virusov. Je učinkovitejša kot druge metode zlivanja, saj omogoča optimizacijo električnih in drugih parametrov za vsak sistem posebej. Le-to omogoča izdelavo posebnih mikrokomor (mikročipov), ki obetajo poleg večje učinkovitosti tudi možnost dodatne avtomatske obdelave zlitih celic (zaznavanje, ločevanje, ipd).

LITERATURA

1. Witze E, Rothman JH. Cell fusion: an efficient sculptor. Curr Biol. 2002; 12 (13): R467–9.
2. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature. 2003; 422 (6934): 901–4.
3. Podbilewicz B. Cell fusion. In: Kramer JM, Moerman DG, eds. WormBook. The online review of C. elegans Biology. Research Community; 2006.
4. Chen EH, Grote E, Mohler W, et al. Cell-cell fusion. FEBS Lett. 2007; 581 (11): 2181–93.
5. Martens S, McMahon HT. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008; 9 (7): 543–56.
6. Chernomordik LV, Kozlov MM. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. Annu Rev Biochem. 2003; 72: 175–207.
7. Köhler G, Milstein C. Continues culture of fused cells secreting antibody of predefined specifity. Nature 1975; 256 (5517): 495–7.
8. Barbuto J, Ensina LF, Neves AR, et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. Cancer Immunol, Immunother. 2004; 53 (12): 1111–8.
9. Scott-Taylor TH, Pettengell R, Clarke I, et al. Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofu - sion: potential for cancer vaccines. Biochim Biophys Acta. 2000; 1500: 265–79.
10. Schirrmacher V, Feuerer M, Fournier P, et al. T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protec - tive anti-tumor immunity. Trends Mol Med. 2003; 9 (12): 526–34.
11. Rodić N, Rutenberg MS, Terada N. Cell fusion and reprogramming: resolving our transdifferences. Trends Mol Med. 2004; 10 (3): 93–6.
12. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature 2003; 425 (6961): 968–73.
13. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature. 2003; 422 (6934): 897–901.
14. Heller R, Grasso RJ. Transfer of human membrane surface components by incorporating human cells into intact animal tissue by cell-tissue electrofusion in vivo. Biochim Biophys Acta. 1990; 1024 (1): 185–8.
15. Zimmermann D, Terpitz U, Zhou A, et al. Biophysical characterisation of electrofused giant HEK293-cells as a novel electrophysiological expression system. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 348 (2): 673–81.
16. Barski G, Sorieul S, Cornefert F. Hybrid type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains. J Natl Cancer Inst. 1961; 26: 1269–91.
17. Senda M, Takeda J, Abe S, et al. Induction of cell fusion of plant-protoplasts by electrical-stimulation. Plant Cell Physiol. 1979; 20 (7): 1441–3.
18. Vassilopoulos G, Russell DW. Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. Curr Opin Genet Dev. 2003; 13 (5): 480–5.
19. Dimitrov. DS, Electroporation and electrofusion of membranes. In: Lipowsky R, Sackmann E, eds. Handbook of biological physics. Elesvier Science; 1995. p. 851–900.

20. Kotnik T, Maček Lebar A, Kandušer M, et al. Elektroporacija celične membrane: teorija ter poizkusi in vitro. Med Razgl. 2005, 44 (1): 81–90.
21. Zhelev DV, Dimitrov DS, Doinov P. Correlation between physical parameters in electrofusion and electroporation of protoplasts. Bioelectrochem Bioenerg. 1988; 20 (1–3): 155–67.
22. Teissie J, Rols MP. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. Biophys J 1993; 65 (1): 409–13.
23. Trontelj K, Reberšek M, Kandušer M, et al. Optimization of bulk cell electrofusion in vitro for production of human-mouse heterohybridoma cells. Bioelectrochemistry 2008; 74: 124–9.
24. Neumann E, Gerisch G, Opatz K. Cell fusion induced by high electric impulses applied to dictyostelium. Naturwissenschaften. 1980; 67: 414–5.
25. Jaroszeski MJ, Gilbert R, Heller R. Detection and quantitation of cell-cell electrofusion products by flow cytometry. Anal Biochem. 1994; 216 (2): 271–5.
26. Ramos C, Bonenfant D, Teissie J. Cell hybridization by electrofusion on filters. Anal Biochem. 2002; 302 (2): 213–9.
27. Lo MM, Tsong TY, Conrad MK, et al. Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. Nature. 1984; 310 (5980): 792–4.
28. Fox MB, Esveld DC, Valero A, et al. Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. Anal Bioanal Chem. 2006; 385 (3): 474–85.
29. Cao Y, Yang J, Yin ZQ, et al. Study of high-throughput cell electrofusion in a microelectrode-array chip. Microfluid Nanofluidics. 2008; 5: 669–75.
30. Teissie J, Knutson VP, Tsong TY, et al. Electric pulse-induced fusion of 3T3 cells in monolayer culture. Science. 1982; 216 (4545): 537–8.
31. Ušaj M, Kandušer M, Trontelj K, et al. Electrofusion and viability of mouse melanoma (B16-F1) and Chinese hamster ovary (CHO) cells. XXth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics; 2009 May 10–14; Sibiu, Romania.
32. Sowers AE. A long-lived fusogenic state is induced in erythrocyte ghosts by electric pulses. J Cell Biol. 1986; 102 (4): 1358–62.
33. Teissie J, Rols MP. Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electropermeabilization. Biochem Biophys Res Commun. 1986; 140 (1): 258–66.
34. Maček Lebar A, Miklavčič D. Cell electropermeabilization to small molecules in vitro: control by pulse parameters. Radiology and Oncology. 2001; 35: 193–202.
35. Dimitrov DS, Sowers AE. Membrane electroporation – fast molecular exchange by electroosmosis. Biochim Biophys Acta. 1990; 1022 (3): 381–92.
36. Gabrijel M, Repnik U, Kreft M, et al. Quantification of cell hybridoma yields with confocal microscopy and flow cytometry. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 314 (3): 717–23.

Prispelo 1. 12. 2009