

Kleine Zellen, großes Wachstum

Für viele Experimente am Institut benötigen Wissenschaftler immense Mengen an frischen Zellkulturen – von Hefen ebenso wie vom Menschen – etwa, um Struktur und Funktion von zellulären Nanomaschinen wie Spleißosomen oder Polymerasen zu untersuchen. Für konstanten Nachschub an Zellen sorgt Thomas Conrad, Leiter der Bioreaktor-Facility des MPI-BPC. Doch Zellen wachsen zu lassen ist nicht so trivial, wie man vermuten könnte.



Es blitzt und blinkt in den beiden Räumen der Bioreaktor-Facility im obersten Stock von Turm 3. In großen Tanks aus blitzblankem Edelstahl, den sogenannten Fermentern oder Bioreaktoren, wachsen hier menschliche Zellkulturen ebenso wie Hefen. Die Fermenter sind ausgerüstet mit modernster Technik. Zahlreiche Rohre und Schläuche münden in die Tanks, Ventile regeln den Durchfluss von Wachstumsmedium und Gasen, die verschiedenen Parameter werden mithilfe spezieller Software überwacht. Die hier geernteten Zellmassen sind für molekularbiologische, nicht-industrielle Maßstäbe riesig: „Mehr als ein Kilo Biomasse aus Hefezellen gewinnen wir aus dem großen Fermenter, und das mitunter mehrmals pro Woche“, berichtet Thomas Conrad. „Dabei achten wir eigentlich gar nicht auf Quantität, sondern auf die Qualität. In unserem Fall heißt

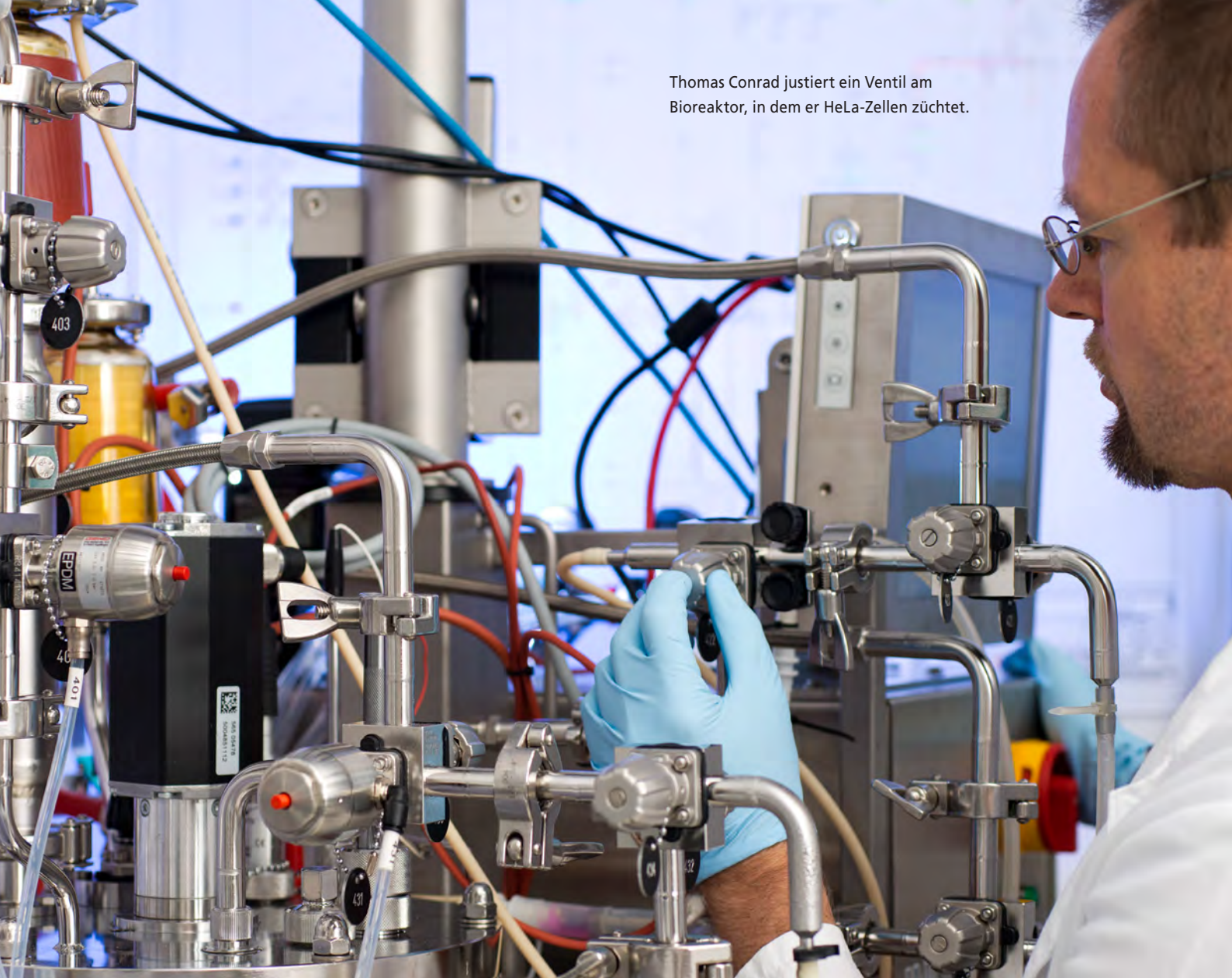
das: kontrolliertes Wachstum und exakt definierte und somit reproduzierbare Bedingungen zum Zeitpunkt der Ernte.“ Größte Abnehmer für die Hefen sind zurzeit die Abteilungen *Molekularbiologie* von Patrick Cramer und *Zelluläre Biochemie* von Reinhard Lührmann. Deren Mitarbeiter sind auf reichlich Zellen angewiesen, denn aus ihnen isolieren sie ihre Forschungsobjekte, die Polymerasen und Spleißosomen.

Auch die Menge der in der Bioreaktor-Facility produzierten menschlichen Krebszellen beeindruckt: „Im regulären Betrieb ernten wir hier drei Mal in der Woche je etwa 300 Gramm Zellmasse, das sind mehrere hundert Milliarden Zellen.“ Über das Jahr produziert die Facility so bis zu 50 Kilogramm Biomasse aus einer menschlichen Zelllinie für die Wissenschaft – eine in der öffentlichen Forschung in Deutschland wahrscheinlich konkurrenzlos große Menge.

Diese gewaltigen Zellmassen nutzen vor allem die Wissenschaftler der Abteilung *Zelluläre Biochemie*, zu der das Hefe-Technikum und die Bioreaktor-Facility gehören. Die Zellen liefern ihnen jene Komplexe aus Proteinen und RNA, die Spleißosomen, deren Aufbau, Funktion und Struktur sie untersuchen.

Über Nacht wird aus wenigen Gramm Hefezellen mehr als ein Kilo

Ein riesiger Fermenter thront in der Mitte des größeren der beiden Laborräume, dem Hefe-Technikum. Er fasst 250 Liter. In ihm kultiviert Thomas Schulz für die Abteilung *Molekularbiologie* gerade Hefezellen. Die Hefepilze wachsen im sogenannten Batch-Verfahren: An einem Tag wird die Kultur ‚angeimpft‘, am folgenden das komplette Volumen geerntet. Innerhalb dieser kurzen Zeit wachsen die Hefezellen von wenigen Gramm zu mehr als einem Kilo. Dafür



benötigen sie ideale Bedingungen, unter anderem große Mengen Zucker in Form reiner Glucose. Theoretisch könnten die Hefezellen noch länger wachsen und entsprechend ließe sich eine größere Menge Zellen gewinnen. Doch geerntet wird bereits am Anfang der Wachstumsphase, denn dann geht es den Zellen besonders gut und sie produzieren reichlich Polymerasen und Spleißosomen. „Für die Ernte haben wir eine spezielle Zentrifuge“, erläutert Thomas Schulz. „Sie trennt die Hefen in den 250 Litern Kulturmedium innerhalb von gerade mal 40 Minuten von der restlichen Flüssigkeit.“

Thomas Conrad geht durch einen Unterdruck-Korridor hinüber in den anderen, wesentlich kleineren Laborraum, die eigentliche Zellkultur. Diese ist vollgestellt mit Sterilbänken und Technik. Es zischt und surrt. Der wichtigste Gegenstand dort ist ein Fermenter mittlerer

Größe in einer Ecke. Seine Bewohner sind weitaus aufwendiger bei Laune – und damit vital und am Wachsen – zu halten als die genügsamen Hefen im großen Raum nebenan.

»Wir können bis zu einem Kilo Krebszellen pro Woche ernten.«

Thomas Conrad

In dem vergleichsweise geringen Volumen von 20 Litern vermehren sich hier HeLa-Zellen, menschliche Krebszellen. Und das ohne Pause. „Anders als Hefezellen werden die Krebszellen nicht im Batch-Verfahren kultiviert, sondern mittels sogenannter kontinuierlicher Perfusion“, erklärt Thomas Conrad. Bei diesem Kultivierungsmodus wächst die Zellkultur, während ständig altes

Nährmedium durch neues ersetzt wird. Geerntet wird nie die gesamte Kultur, ein kleiner Teil verbleibt stets für die weitere Produktion im Bioreaktor. Thomas Conrad schaltet das Licht im Fermenter ein. Durch ein schmales Glasfenster ist das rötliche Nährmedium zu erkennen. Damit die Zellen sich schnell vermehren, muss alles stimmen: Die Temperatur, der pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlendioxid-Gehalt der Luft, der Druck im Reaktor, die Zufuhr von frischem und die Abfuhr von verbrauchtem Medium.

Bei so vielen Prozessparametern mit den dazugehörigen Stellgliedern sind Zwischenfälle vorprogrammiert. „Ein Prozess läuft selten über längere Zeit störungsfrei“, betont Thomas Conrad, während er Messwerte auf einem Monitor betrachtet. Trotz aller Routine ist die Kultivierung von menschlichen Zellen in großen Mengen zu komplex, als dass sie langfristig reibungslos funktionieren

könnte. „In der Regel betreibt man einen Zellkulturprozess über eine Kampagnendauer von wenigen Tagen. In unserer Zellkultur arbeiten wir allerdings mit Kampagnendauern von mehreren Monaten.“

Thomas Conrads Expertise geht deutlich über sein eigentliches Fach, die Biologie, hinaus: „Im Prinzip arbeite ich mit Informatik, Mess- und Regeltechnik, mit Sensorelektronik, Mechanik, sterilem Handling, Biochemie und Zellbiologie“, listet er auf. Und diese Vielfalt sei es auch, die er an seiner Arbeit so schätze.

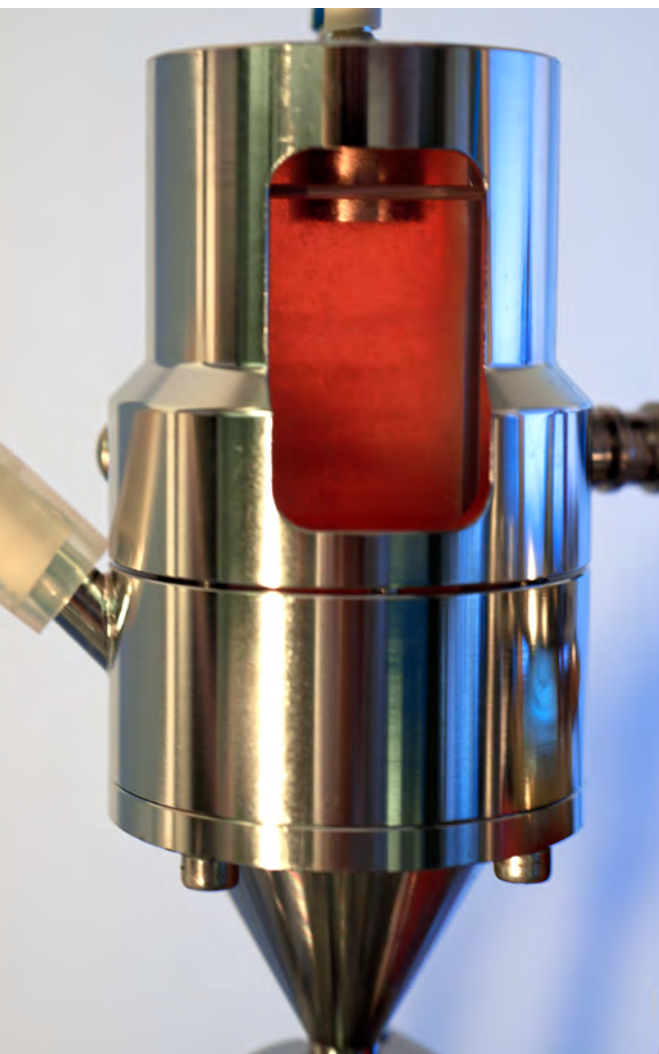
Die Messwerte an den Fermentern kontrolliert Thomas Conrad fortwährend. Auch am Wochenende schaut er nach seinen ‚Schützlingen‘. „Zwar kann ich alle Prozessdaten auch von zu Hause aus einsehen, aber vieles lässt sich nur vor Ort überprüfen und gegebenenfalls korrigieren“, schildert der Biologe. „Es passiert schon mal, dass der Separator ausfällt, der das verbrauchte Medium von den Zellen trennt. Auch die Sonde, die die Biomasse im Reaktor kontrol-

liert, neigt zu Messabweichungen. Dann muss ich nachjustieren.“ Außerdem können Stromausfälle einen laufenden Prozess gefährden. Nur wenige Male im Jahr wird der Fermenter für einige Tage regulär stillgelegt, zum Beispiel über die Weihnachtsfeiertage.

Seit inzwischen 20 Jahren wacht Thomas Conrad über das sensible Zellwachstum und hat schon zahlreiche knifflige Situationen gemeistert. Erfahrung, die er gut gebrauchen kann. Kleinere Störungen sind das alltägliche Geschäft. Dramatisch wird es dagegen, wenn sich ungebetene Gäste in die Zellkultur schleichen: „Kontaminationen sind unser *worst case*. Sie passieren relativ selten – aber wenn, dann muss ich die gesamte Produktion stoppen, den Fermenter reinigen und alles sterilisieren.“ Meistens sind die Übeltäter die allgegenwärtigen Koli-Bakterien. Wenn sie eindringen, ist die Kultur verloren. Für die Forscher versiegt dann vorübergehend der Nachschub an Zellmaterial, und wichtige Experimente müssen auf-

geschoben werden. Thomas Conrad setzt alles daran, das zu vermeiden. Seit März wachsen die HeLa-Zellen in einem neuen, moderneren Fermenter. Den alten Bioreaktor will er demnächst parallel zum neuen wieder in Betrieb nehmen. Sollten sich dann einmal Bakterien in einen der beiden Reaktoren schleichen, stünde der zweite als Reserve zur Verfügung und könnte weiter Zellen produzieren.

Neben der Zucht von Hefen und Krebszellen für die Forscher am Institut hat Thomas Conrad in der Vergangenheit auch externe Aufträge – ausschließlich im Rahmen von Kooperationen – von der Universitätsmedizin Göttingen und dem MPI für Experimentelle Medizin übernommen. „Unterschiedliche Insektenzellen hatten wir hier schon, zum Beispiel von einem Nachtfalter. Außerdem haben wir Antikörper und in kleinem Maßstab auch Viren produziert.“ Stressfrei ist Thomas Conrads Job nicht – aber abwechslungsreich allemal. (fk)



HeLa-Zellen

HeLa ist die älteste in der Forschung verwendete menschliche Zelllinie. Sie wurde im Jahr 1951 aus dem Gebärmutterhals-Tumor der amerikanischen Patientin Henrietta Lacks isoliert und nach ihr benannt. Da die Zelllinie unbegrenzt wachsen kann – also praktisch ‚unsterblich‘ ist, außerdem widerstandsfähig ist und sich schnell vermehrt, wird sie auch heute noch, 65 Jahre nach ihrer Etablierung, wahrscheinlich häufiger als jede andere menschliche Zelllinie für wissenschaftliche Experimente verwendet. Unter idealen Bedingungen teilen sich HeLa-Zellen etwa alle 24 Stunden.

Um verbrauchtes Medium aus der HeLa-Zellkultur entfernen zu können, muss es zunächst von den Zellen getrennt werden. Das geschieht mithilfe eines Zell-Separators: Ein sogenannter Piezo-Kristall erzeugt eine stehende Ultraschallwelle im Medium. Die Zellen reichern sich in den Bereichen mit niedrigem Druck an. Aus dem zellarmen Hochdruck-Bereich wird das Medium abgesaugt.

In order to remove used medium from the HeLa cell culture, it needs to be separated from the cells first. This is done by the cell separator: A so-called Piezo crystal generates a stationary ultrasound wave in the medium. The cells are enriched in the area of low pressure. From the almost cell-free area of high pressure the medium is removed.

Tiny cells, tremendous growth

For many experiments scientists at the institute need immense quantities of fresh cell culture – both from yeast and from man. The researchers use these cells to investigate the structure and function of cellular nanomachines such as spliceosomes or polymerases. Ensuring constant supplies of cells is the job of Thomas Conrad, head of the Bioreactor Facility at the MPI-BPC. However, to grow cells is not as trivial as one may think.

The two rooms of the Bioreactor Facility on the upmost floor of tower 3 sparkle and glint. Here, in huge containers of spick and span stainless steel, called fermenters or bioreactors, yeast and human cell cultures grow. The fermenters are equipped with latest technology. Numerous pipes and tubes lead into the tanks, valves control the flow of growth medium and gas, the many parameters are monitored by special computer software. By biochemical, non-industrial standards the amounts of cells harvested here are gigantic: “More than one kilo of yeast cells we get from the big fermenter, and that usually more than once a week,” Thomas Conrad states. “However, we actually do not look at quantity, but at the quality. In our case that means: controlled growth and precisely defined and thus reproducible conditions at the time of harvest.” Biggest ‘customers’ for yeast are presently the Departments of *Molecular Biology* of Patrick Cramer and *Cellular Biochemistry* of Reinhard Lührmann. Their co-workers require huge amounts of cells from which they isolate their objects of interest, the polymerases and spliceosomes.

The quantities of human cancer cells produced in the bioreactor facility are no less impressive: “During normal operation we harvest three times a week, each time about 300 grams cell mass. That is several hundred billion cells.” In one year the facility thus produces up to 50 kilograms biomass from human cell culture for research – an enormous amount that is probably without competition in public research in Germany. This gigantic cell mass is chiefly used by scientists at the Department of *Cellular Biochemistry*, to which the Bioreactor Facility

and the yeast lab belong. The cells yield those complexes of proteins and RNAs, the spliceosomes, whose structure and function is investigated by the researchers.

Over night a few grams of yeast cells turn into more than one kilo

A huge fermenter sits in the middle of the larger of the two laboratories, in the yeast lab. It holds 250 liters. In it, Thomas Schulz cultivates yeast cells for the Department of *Molecular Biology*. The yeast fungus grows in so-called batch procedure: On one day, the culture is ‘inoculated’, the following day the complete volume is harvested. Within this short time the yeast grows from a few grams to more than one kilo. For that, it requires ideal conditions. Among other things, it polishes off huge amounts of sugar in form of pure glucose. In principle, yeast cells could grow much longer and more cells could be collected. However, here, the cells are harvested at the beginning of their growth period, for at that time point they are well and produce ample amounts of polymerases and spliceosomes. “For the harvest we have a special centrifuge,” Thomas Schulz points out. “It separates the yeast in the 250 liters of culture medium from the remaining liquid within 40 minutes.”

Thomas Conrad crosses a low-pressure corridor and enters the second, much smaller lab, the actual cell culture. It is crammed with clean benches and technical equipment. A hissing and humming fills the air. The most important item in the room is a medium-sized fermenter in one corner. Its inhabitants are much harder to keep happy – and



Thomas Schulz of the Department of *Molecular Biology* inspects the yeast fermenter.

thus vital and growing – than the undemanding yeast in the large room next door. In the comparably small volume of 20 liters HeLa cells, these are human cancer cells, multiply. And they do so without a break. “Unlike yeast cells, we do not cultivate cancer cells in batch procedure, but by using so-called continuous perfusion,” Thomas Conrad explains. With this mode of cultivation the cell culture grows while old growth medium is continually replaced by fresh. Never the whole culture is harvested, a small part always remains in the bioreactor for further production.



Thomas Conrad switches on the light inside the fermenter. Through a small glass window the red growth medium is visible. For the cells to multiply fast, everything has to be perfect: Temperature, pH, oxygen and carbon dioxide concentration of the air, the pressure inside the reactor, the supply with fresh and the collection of old medium.

»We can harvest close to one kilo of cancer cells per week.«

Thomas Conrad

With so many process parameters and actuators, incidents are inevitable. "A process hardly ever runs smoothly over a longer period," Thomas Conrad stresses while watching values on a screen. In spite of all routine, the cultivation of human cells in huge quantities is too complex to run trouble-free in the long term. "Normally, a cell culture process is run over a period of a view days. In our cell culture, however, we work with periods of several months."

Thomas Conrad's expertise reaches out far beyond his own field biology: "In principle I work with informatics, measurement and control technology, with sensor electronics, mechanics, sterile handling, biochemistry, and cell biology," he lists. And this diversity is also what he values particularly in regard to his work, he adds.

Thomas Conrad constantly checks the fermenter's parameters. Also at the weekends he watches over his 'charges' "I can look at the process data from home. However, a lot of things can only be examined and – if necessary - fixed on site," the biologist says. "It occasionally happens that the separator which removes the used medium from the cells gets jammed. Also the sensor controlling the biomass in the reactor tends to deviate in its measurements. Then I have to adjust." Furthermore, powercuts occasionally disturb a running process.

Only a few times a year the fermenter is regularly shut down, for instance over Christmas.

For 20 years already, Thomas Conrad has been keeping watch over the sensible cell growth, and he mastered numerous tricky situations. Experience that he can use well. Smaller incidences are his daily business. Much more dramatic it is when unwanted guests sneak into the cell culture: "Contaminations are our worst case. They are seldom – but if they happen I have to stop the whole production, clean up the fermenter, and sterilize everything." Mostly, the wrongdoers are coli bacteria. If they find their way inside, the culture is doomed. For the researchers that means: no fresh supplies of cell material; important experiments have to be postponed. Thomas Conrad makes every effort to avoid this. Since March, the HeLa cells grow in a new, more modern fermenter. He plans to additionally put the old bioreactor back into operation soon. Then, if bacteria should invade one of the reactors again, the other could serve as backup and still produce cells.

Apart from the cultivation of yeast and cancer cells for the institute's scientists, in the past Thomas Conrad also obtained external commissions – only as part of cooperations – from the University Medicine Göttingen and the MPI for Experimental Medicine. "Insect cells we had, for example from a moth. We also produced antibodies and – in smaller amounts – viruses." Thomas Conrad's job certainly is not stress-free – but definitely diverse. (fk)

HeLa cells

HeLa is the oldest human cell line used in research. It was isolated in 1951 from the cervical tumor of the American patient Henrietta Lacks and named after her. The cell line displays unlimited growth – is hence virtually 'immortal' – is robust and multiplies quickly. Therefore, today, 65 years after its establishment, it is probably used more often for scientific experiments than any other human cell line. Under ideal conditions, HeLa cells divide roughly every 24 hours.

Fünf Fragen

5 Questions to Thomas Conrad



Was ist für Sie das Spannendste an Ihrem Beruf?

Die ständigen neue Herausforderungen, die Überschneidungen zahlreicher Wissensgebiete in meinem Tätigkeitsfeld wie beispielsweise Zellbiologie, Biochemie, Elektrotechnik, Mess- und Regelelektronik, Sensorik, Biotechnologie und weitere technische Aspekte, sowie letztlich die Arbeit an biologischen Systemen.

What fascinates you most about your job?

The ever new challenges, the overlap between various fields of knowledge in my job, such as cell biology, biochemistry, electrical engineering, measurement and control technology, sensor technology, biotechnology, and further technical aspects, and finally working with biological systems.

Welche andere Tätigkeit könnten Sie sich vorstellen?

Vielleicht Astronaut, Lokomotivführer, oder Schiffschaukelbremsen.

If you had to choose a different profession, what would you do?

Possibly astronaut, train driver, or swingboat brakeman.

Wie tanken Sie nach einem harten Arbeitstag Energie?

Zeit mit meiner kleinen Tochter verbringen, mit Freunden musizieren, Sport treiben.

How do you recharge your batteries after a tough day?

Spending time with my little daughter, making music with friends, doing sport.

Welche Begabung hätten Sie gerne?

Ein perfektes Gedächtnis, um maximale Informationsmengen in kürzester Zeit aufnehmen und vor allem wiedergeben zu können, sowie eine beliebig ausweitbare Konzentrationsspanne. Ein fotografisches Gedächtnis zu besitzen wäre auch eine prima Eigenschaft.

Which talent would you like to have?

A perfect memory to take up and reproduce huge quantities of information within short time, and a concentration span as long as I need it. Having a photographic memory would also be a great quality.

Was würden Sie tun, wenn Sie mehr Zeit hätten?

Mehr Zeit mit meiner Familie verbringen, insbesondere längere Reisen mit meinen Liebsten. Und Bücher lesen!

What would you do if you had more time?

Spend more time with my family, especially I would like to go on longer journeys with my loved ones. And read books!

Dank an die Initiatoren der Eltern-Kind-Räume

In der August-Ausgabe der *MPIbpc News* berichteten wir über die neuen Eltern-Kind-Räume am Institut. Die Gleichstellungsbeauftragte Anastassia Stoykova möchte dazu noch ein großes Dankeschön loswerden: an Albena Drycheva von der PhD/Postdoc Community und Martina Daniel, Technische Assistentin am MPI-BPC. „Ihr enthusiastisches Engagement und die große Hilfe beim Organisieren der Räume haben dieses neue Angebot für junge Familien erst möglich gemacht“, sagt Anastassia Stoykova. Mehr Informationen rund um die Eltern-Kind-Räume finden Sie unter https://intranet.mpibpc.mpg.de/498792/eltern_kind_raum (es)

Thanks to the initiators of the parent child rooms

In the August issue of the *MPIbpc News*, we reported on the new parent child rooms at the institute. The Equal Opportunity Officer Anastassia Stoykova wants to add a special thanks to Albena Drycheva of the PhD/Postdoc Community and Martina Daniel, technical assistant at the MPI-BPC. “Their enthusiastic involvement and great help made it possible to establish the new parent child rooms in the first place,” Anastassia Stoykova states. Please find more information about the rooms on the intranet: https://intranet.mpibpc.mpg.de/1226326/eltern_kind_raum (es)