

Foreword: Along the description of the experiments you will find in bold some questions. As preparation we ask you to think about those questions and try to answer them. Your answers will also appear in your report. Along your answers we ask you to provide the source of your reflections (book title and authors, websites, lectures...).

During the experiments you should take notes of what you do since some things might differ from the protocol. This written protocol of yours will be looked at after the FoPra.

Vorwort: Zwischen der Beschreibung der Experimente finden Sie in fett einige Fragen. Wir bitten Sie, diese als Vorbereitung auf das Praktikum zu durchdenken und so gut wie möglich zu beantworten. Ihre Antworten sollen in der Auswertung beschrieben werden. Bitte dokumentieren Sie neben den Antworten zu den Fragen auch immer die Quelle, wo Sie die Antworten gefunden haben (Buchtitel und Autor, Webseiten, Vorlesungen).

Während des Praktikums wird erwartet, dass Sie sich aufschreiben, was genau Sie machen. Einige Dinge können verschieden von dem Protokoll sein oder sind noch nicht im Detail beschrieben. Dieses von Ihnen geführte Protokoll wird nachträglich kontrolliert.

Cell polarity is the term that defines the orientation of a cell in space as well as its inner organization of different organelles. One simple example for living cells which are polar are intestine epithelial cells. These cells' task is to let nutrients pass through the barrier of the intestine to reach the blood circulation. It is important for the entire organism that the exchange of material is in this one direction only. To that end, intestinal cells have a dedicated anisotropic organization and geometry: they are polar.

Zellpolarität ist definiert als die Orientierung einer Zelle im Raum und die Organisation der verschiedenen Organellen. Ein einfaches Beispiel für lebende Zellen, die polar sind, sind Darm-Epithelzellen. Aufgabe dieser Zellen ist der Transport von Nährstoffen durch die Barriere des Darms in den Blutkreislauf. Es ist für den Gesamtorganismus wichtig, dass der Stoffaustausch nur in dieser einen Richtung erfolgt. Zu diesem Zweck haben Darmzellen eine dedizierte anisotrope Organisation und Geometrie: sie sind polar.

Another important example of cell polarity is found in cell migration. This is the translocation of cells in space and time. In this process, when a cell moves from one place to another place in the tissue, cells have a particular direction in which they are going. This means, one can define a front and a back of the cell. At a molecular level the front and the back are indeed different in terms of composition and activity: while the front has a whole machinery to protrude new membrane, the back exerts contractile forces to produce the actual movement. On top of that, cells frequently change direction during their migration. This means that they are able to re-define a front-back axis within seconds, meaning that they re-polarize.

Ein weiteres wichtiges Beispiel für Zellpolarität ist die Zellmigration: die Ortsverlagerung der Zellen in den Raumrichtungen während einer gewissen Zeit. Während dieses Vorgangs, der

Bewegung einer Zelle von einer Stelle im Gewebe zur anderen, wandert die Zelle in eine bestimmte Richtung. Das bedeutet, man kann Vorder- und Rückseite der Zelle festlegen. Auf molekularem Niveau sind tatsächlich Vorder- und Rückseite der Zellen bezüglich Zusammensetzung und Aktivität verschieden: während die Vorderseite eine ganze Maschinerie hat um neue Membranen vorzustoßen, übt die Rückseite Kontraktionskräfte aus, um die tatsächliche Fortbewegung auszuführen. Hinzu kommt, dass Zellen häufig die Richtung während ihrer Migration ändern, d.h. sie sind fähig, innerhalb von Sekunden eine horizontale Achse neu zu definieren, d.h. sie polarisieren von neuem.

When cells are cultivated on 2D substrates and in absence of any chemical cues they spontaneously adopt a random polarity. However it is possible for an experimentalist to play with this polarity with the help of chemicals. Indeed, *in vivo* cells may find their orientation or direction of migration by the mean of external gradients to which they orient. Briefly, the presence of a particular component will induce changes at the membrane and these changes cascade to eventually recruit specific factors which will induce the reorientation (or the orientation keeping) of the cell.

Wenn Zellen auf 2D- Substraten und in Abwesenheit von chemischen Signalstoffen kultiviert werden, nehmen sie spontan eine zufällige Polarität an. Dennoch ist es für einen Experimentator möglich, mit Hilfe von Chemikalien mit dieser Polarität zu spielen. Tatsächlich können Zellen *in vivo* ihre Orientierung oder Migrationsrichtung mittels externer Gradienten, an welchen sie sich orientieren, finden. Kurz gesagt, die Anwesenheit einer bestimmten Komponente wird Veränderungen auf der Membran induzieren und diese Veränderungen kaskadieren zu eventuellem Anhäufen spezifischer Faktoren, was eine Reorientierung der Zelle induzieren wird (oder das Beibehalten der Orientierung).

Find further examples from living material where polarity might play a role.

How is polarity defined in pure physics? Where are the parallels?

Finden Sie weitere Beispiele aus lebendem Material, wo Polarität eine Rolle spielen

könnte. Wie wird die Polarität in der reinen Physik definiert? Wo sind die Parallelen?

Since there is a direct correlation between the cell polarity and its shape, researchers were interested in seeing if one could force a cell's polarity by simply forcing it on a specific shape using so-called micro patterns.

The main goal of these experiments will be to make a correlation between the cell shape (e.g. the shape of the pattern) and the polarity of the cells, measuring the axis between cellular organelles.

Da es eine direkte Korrelation zwischen der Polarität und Form der Zelle gibt, interessiert es Forscher, ob man die Polarität einer Zelle erzwingen kann, indem man sie einfach auf eine bestimmte Form - unter Verwendung von sogenannten Mikromustern - zwingt.

Das Hauptziel dieser Versuche ist es zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen der Zellform (bzw der Form des Musters) und der Polarität der Zellen vorhanden ist. Diese wird über die Achse zwischen Zellorganellen gemessen.

Micro patterning

Mikrostrukturierung

For several years now, people have developed techniques to create structured surfaces to control the cell shape. The main goal of all those is to have a “sticky” microstructure on which cells can adhere surrounded by a non-adherent surface so that they can't escape the pattern.

Among those techniques, one the first ones was to use self-assembled monolayers (SAM). The principle is, by use of microfabrication, to mask some part of a surface which is in turn functionalized with a silage on which cells can't adhere. After removal of the remaining photoresist, the native surface is functionalized with another, reactive, silage on which adhesion cues can be grafted.

A much cheaper but somewhat less reliable alternative is to use micro-contact printing. In that case, an adhesion protein is transferred on a glass surface via an elastomer stamp. The remaining glass is then passivated by a non-adherent cue.

Vor einigen Jahren hat man Techniken zur Bildung strukturierter Oberflächen entwickelt um die Zellform vorzugeben. Das Hauptziel ist es, eine “klebrige” Mikrostruktur zu erhalten, an welcher Zellen, umgeben von nicht haftenden Flächen, so fest haften können, dass sie von dem “pattern” nicht mehr wegkommen.

Unter den Techniken war eine der ersten die Verwendung von selbstorganisierenden Monoschichten (SAM). Das Prinzip besteht darin mit Hilfe der Mikrofabrikation eine Oberfläche teilweise zu verdecken. Dann wird die unbedeckte Oberfläche mit einer Beschichtung funktionalisiert, auf der Zellen nicht haften können. Nach Entfernen des verbleibenden Fotolacks wird der Rest der Oberfläche mit einer anderen, reaktiven Beschichtung funktionalisiert, auf der Adhäsionsmoleküle aufgebracht werden können.

Eine billigere, aber etwas weniger zuverlässige Alternative ist es, Mikrokontaktdruck zu verwenden. In diesem Fall wird ein Adhäsionsprotein auf einer Glasoberfläche via Elastomerabdruck übertragen. Dann wird das verbleibende Glas durch geeignete Passivierung nichthaftend gemacht.

Find a schemata of micro contact printing and explain it.

Finden Sie ein Verfahren für Mikrokontaktdruck und erklären Sie es.

In both cases, when cells are cast over the micro patterned surface, they will find small adhering islands with a defined shape on which they will spread without being able to leave.

In beiden Fällen werden die Zellen auf die mikrostrukturierten Oberfläche gegeben. Sobald sie in die Nähe dieser kleinen "klebrige" Inseln mit einer definierten Form kommen werden sich die Zellen darauf ausbreiten, ohne diese Formen wieder verlassen zu können.

Deep-UV micro patterning

Tiefes-UV Mikrostrukturierung

For the experiments of this Fopra, deep UV micro patterning will be used. For this technique, a glass coverslip is activated by plasma (creates negative charges on the surface) before being exposed to Poly-L-Lysine grafted Poly(ethylene)glycol (Pall-g-PEG, positively charged). The poly-L-lysine backbone will stick to the surface and expose the PEG chains towards the exterior, leading to a PEGylated surface. PEG is protein repellent so that cells can't create any adhesion point on it.

The functionalized surface will then be exposed to Deep-UV through a photomask bearing the shape of the wanted patterns. Deep-UV illumination (wavelength less than 200 nm) is energetic enough to break the C-O-C bond linking the PEG chains to the poly-L-lysine chain, replacing it by a pH sensitive and reactive carboxylate group.

The surface is then incubated with an adhesive protein, the fibronectin, at a basic pH to graft the protein to the surface via the carboxylate groups. This results in small fibronectin adhesive islands surrounded by a protein-repellent PEG surface. Figure 1 describes the final state of the preparation.

In diesem Fopra, wird die sogenannte tiefes UV Mikrostrukturierung eingesetzt. Für diese Technik wird ein Deckglas durch Plasma aktiviert, dies erzeugt negative Ladungen auf der Oberfläche. Danach wird es mit Poly-L-Lysin, gelöst in Poly-(Ethylen-)Glycol (Pll-g-PEG, positiv geladen) behandelt. Das Poly-L-Lysin-Grundgerüst haftet fest an der Oberfläche und die PEG-Ketten richten sich nach außen, eine PEGylierte Oberfläche entsteht. PEG ist so Protein-abweisend, dass die Zellen an keinem Punkt anhaften können.

Diese funktionalisierte Oberfläche wird dann tiefem UV ausgesetzt, allerdings nicht direkt sondern durch eine Fotomaske mit den Mustern der gewünschten Form. Beleuchtung im tiefen UV-Bereich (Wellenlänge kleiner als 200nm) ist energiereich genug, um die C-O-C – Bindung, welche die PEG-Ketten mit der Poly-L-Lysin-Kette verknüpft, aufzubrechen und sie durch eine pH-empfindliche und reaktive Carboxylat-Gruppe zu ersetzen.

Die Oberfläche wird dann im alkalischen mit einem Klebprotein, dem Fibronektin, inkubiert, um das Protein an der Oberfläche auf dem Weg über die Carboxylatgruppen anzubringen. Das Resultat sind kleine Fibronektin-anhaftende Inseln umgeben von einer Protein-abweisenden PEG-Oberfläche. Fig. 1 beschreibt das letzte Versuchsstadium dieses Versuches.

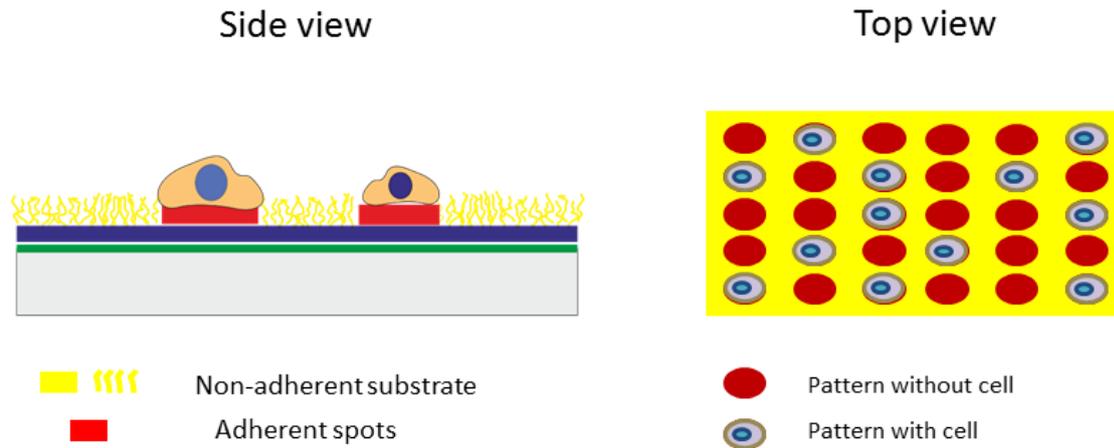


Figure 1. Top and side view of a micropatterned surface with cells adhering on some of the patterns.

Bild 1: Drauf- und Seitenansicht einer mikrostrukturierten Oberfläche mit Zellen, welche auf einigen der Mikromuster sitzen.

Based on this description, try to make your own scheme of principle of Deep-UV micro patterning technique (e.g. in Illustrator, Coreldraw, Powerpoint, Inkscape ...).

Versuchen Sie, basierend auf dieser Beschreibung, Ihr eigenes Schema über das Prinzip der tiefen UV-Mikrostrukturierungstechnik zu entwerfen (z.B. in Illustrator, Coreldraw, Powerpoint, Inkscape ...).

Cell organelles

Zellorganellen

Defining the polarity of a cell can be done in different ways, depending on interest. There are specific markers of polarity that trigger the (re)organization of cells. In the experiments of this FoPra, we will focus on spread cells (well adhered to the surface) and determine their orientation by investigating the position of their nucleus and their cytoskeleton.

Die Definition der Zellpolarität kann je nach Interesse auf verschiedenen Wegen erfolgen. Es gibt spezifische Polaritäts-Marker, die die (Re-)Organisation von Zellen auslösen. In den Experimenten dieses FoPras werden wir uns auf gut ausgebreitete Zellen konzentrieren (Zellen, welche gut an der Oberfläche haften). Die Orientierung dieser Zellen wird durch die Lage ihres Kern und ihres Zytoskeletts untersucht werden.

What do you know about a cell nucleus? What is its content and why is it required for the cell?

Give a brief introduction about the cytoskeleton: What is it for? What is it composed of? More particularly, describe what microtubules are and how they are built. Find basic information about the three main types of tubulin.

Was wissen Sie über den Zellkern? Was ist sein Inhalt und warum ist er für die Zelle nötig?

Geben Sie eine kurze Einführung über das Zytoskelett: Welche Funktion hat es? Wie ist es aufgebaut? Beschreiben Sie insbesondere, was Mikrotubuli sind und wie sie aufgebaut sind. Finden Sie grundlegende Informationen über die drei Haupttypen von Tubulin.

To define an axis of polarity, we will look at the axis between the center of the nucleus and the microtubule organizing center (MTOC). For the experiments of this FoPra you will prepare micro patterned surfaces with four different geometries: circles, triangles, ellipses with a ratio between their main axis of 2 and ellipses with a ratio of 3.

Cells will be seeded on those surfaces. They spread over a time course of 3 to 4 hours. Images of cell nuclei and the microtubule network will then be recorded during the rest of first day using fluorescent microscopy.

Um eine Polaritätsachse zu definieren, werden wir uns die Achse zwischen dem Zentrum des Kerns und dem Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC) ansehen. Für die Versuche dieses FoPras werden Sie mikrostrukturierte Oberflächen mit vier verschiedenen Geometrien herzustellen: Kreise, Dreiecke, Ellipsen mit einem Verhältnis zwischen ihren Hauptachsen von 2 und Ellipsen mit einem Verhältnis von 3. Die Zellen werden auf diesen Flächen ausgesät werden. Sie breiten sich über einen Zeitraum von 3 bis 4 Stunden aus. Bilder der Zellkerne und des Mikrotubuli-Netzwerkes werden dann für den Rest des ersten Tages unter Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet.

What are the main optical components of a microscope? What is called inverted microscopy?

What is the principle of fluorescence? For fluorescent microscopy in cells, what are the main problems and what solution do we have to solve them? (and no, the answer to that one is not in the German Wikipedia ;-) - but feel free to add it there!)

Was sind die wichtigsten optischen Komponenten eines Mikroskops?

Was ist Invere Mikroskopie? Was ist Fluoreszenz? Was sind die Hauptprobleme bei der Fluoreszenz-Mikroskopie an Zellen und welche Lösungen gibt es? (und nein, die Antwort dazu findet man nicht auf der deutschen Wikipedia Seite ;-) - aber Sie dürfen sie gerne dort hinzuzufügen!)

On the second day, data will be analyzed and evaluated. Images will be treated so that we can compare them with each other and that we can detect the nucleus and MTOC. The output data will be the angle formed by the axis drawn between those organelles and one chosen axis of the pattern. The distribution of these angles will then be represented on comprehensive graphs in order to check if the shape of a cell has an influence on its inner organization. Ideas, how such comprehensive graphs might look like are supposed to come from you.

Analyse und Auswertung der Daten werden am zweiten Tag erfolgen. Bilder werden so bearbeitet werden, dass Sie sie miteinander vergleichen können sowie den Kern und MTOC

erkennen können. Die Output Daten sollen als Winkel zwischen der Achse, auf der diese Organellen liegen und einer gewählten Pattern-Achse abgebildet werden. Die Verteilung dieser Winkel wird dann in einem verständlichen Diagrammen dargestellt, um zu prüfen, ob die Form einer Zelle einen Einfluss auf ihre innere Organisation der Zelle hat. Ideen, wie solche verständlichen Diagramme aussehen können, sollten von Ihnen kommen.

Cell adhesion

This technique only works when cells adhere to the substrate.

Find in the literature the principles of cell adhesion. To help you to answer this question, specifically define the following points:

- **What is integrin based adhesion**
- **Which adhesion cues can be found in-vivo**
- **What are focal adhesions**

Try to find evidences that adhesion of cells might be linked to cytoskeletal organization.

Zelladhäsion

Unser Verfahren funktioniert nur, wenn die Zellen am Substrat haften, die Zellen also ‚adhärieren‘.

Finden Sie in der Literatur die Grundsätze der Zelladhäsion. Um Ihnen zu helfen, diese Frage zu beantworten, definieren Sie folgende Punkte:

- **Was ist integrine Adhäsion**
- **Welche Adhäsion-Signale findet man in vivo (im lebenden Körper)**
- **Was sind fokale Adhäsionen**

Versuchen Sie, Anhaltspunkte dafür zu finden, dass die Haftung von Zellen mit der Organisation des Zytoskeletts verknüpft sein könnte.

Protocol

The complete version of the protocol is described here. However, the first part (PEGylation of the coverslip) will not be carried out during the FoPra due to lack of time and has been already prepared for you.

PEGylation of the coverslip

1. Clean glass coverslips with ethanol. Dry them.
2. Cut a Parafilm piece that will be stuck in a large Petri dish.
3. Deposit 40 μ L drops of a solution of PLL-g-PEG at a concentration of 0,1mg/mL. There should be enough space between drops to fit the coverslips. Do one drop per coverslip.
4. Plasma activate the coverslips for 30 seconds (max power).
5. Lay down the coverslips on the PEG solution, activated surface facing the PEG solution.
6. Let incubate for 45 minutes.
7. Rinse the coverslip with water. Add 1mL of water close to the coverslip so that it flows between the coverslip and the Parafilm. If the water doesn't enter, use a tweezer to lift the coverslip.
8. Continue rinsing the coverslip in water several time then dry it. Remember to always know which side is PEGylated.

The coverslips can be stored in that state for several days, preferably at 4°C.

Protokoll

Hier wird die komplette Version des Protokolls beschrieben. Der erste Teil (PEGylierung des Deckglases) wird allerdings wegen Zeitmangels nicht während des FoPras durchgeführt werden, sondern wurde schon für Sie vorbereitet.

PEGylierung des Deckglases

1. Reinigen Sie die Deckgläser mit Ethanol. Trocknen Sie sie.
2. Schneiden Sie ein Stück Parafilm ab, kleben sie es in eine großen Petrischale.
3. Geben Sie 40 μ l-große Tropfen einer PLL-g-PEG Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mg / mL darauf. Es sollte genug Raum zwischen den Tropfen sein, um auch noch die Deckgläser unterzubringen. Nutzen Sie einen Tropfen pro Deckglas.
4. Aktivieren Sie die Deckgläser für 30 Sekunden im Plasma (max. Leistung).
5. Legen Sie die Deckgläser in die PEG-Lösung, die aktivierte Oberfläche der PEG-Lösung zugewandt.
6. Lassen Sie sie 45 Minuten inkubieren.
7. Spülen Sie das Deckglas mit Wasser: geben Sie 1 ml Wasser in der Nähe des Deckglases, so dass es zwischen Deckglas und Parafilm fließt. Wenn das Wasser nicht darunter gesogen wird, verwenden Sie eine Pinzette, um das Deckglas anzuheben.
8. Spülen Sie das Deckglas mehrere Male mit Wasser, dann trocknen Sie es. Denken Sie daran, immer zu wissen, welche Seite die PEGylierte ist.

Das Deckglas kann in diesem Zustand ein paar Tage bei vorzugsweise 4°C aufbewahrt werden.

Irradiation of the coverslip

During this process, it is really important to respect the security rules. First, deep-UV light can be harmful for your vision. You always have to wear protection glasses during this step. Second, oxygen under deep-UV illumination forms ozone. This is the reason why the lamp is under a chemical hood. This hood should be operated properly during the whole process. Last, wear gloves.

1. Take time to recognize the different sides of the mask. One side is golden and will be further called chrome side. The other one is glass like and will be called quartz side.
2. Clean the mask. Use Acetone and ethanol for that purpose. Pay attention not to scratch the mask to avoid replication of those scratches on the patterns.
3. Start the lamp and the fans. These fans help to reduce overheating within the cavity which would lead to evaporation.
4. Illuminate the chrome side of the mask for 5 minutes. This step ensures a partial activation of the mask to make the chrome more hydrophilic, which will be important for the next step.
5. Take the mask out of the lamp and let it cool down. Deposit a 4.5 μ L drop of deionized water in the center of each section you want to reproduce.
6. Lay down the coverslip on the droplet. The PEG side should go in contact of the chrome.
7. With a plastic pipette tip, press on the coverslip to remove excess of water and trapped bubbles. The small quantity of water will allow the glass coverslip to stick on the mask.
8. Place the mask holding the coverslips in the illumination system, this time the quartz side facing the light.
9. Illuminate the mask for 6 minutes.

Bestrahlung des Deckglases

Während der Bestrahlung des Deckglases ist es wirklich wichtig, die Sicherheitsbestimmungen zu beachten. Erstens kann tiefes UV-Licht schädlich für die Augen sein. Man muss bei diesem Schritt immer eine Schutzbrille tragen! Zweitens bildet Sauerstoff unter tiefer UV-Beleuchtung Ozon. Dies ist der Grund, weshalb die Lampe unter einem Abzug steht. Diese Haube soll während des gesamten Verfahrens benutzt werden; tragen Sie ausserdem Handschuhe.

1. Nehmen Sie sich Zeit, um die verschiedenen Seiten der Maske zu erkennen. Eine Seite ist golden und wird im weiteren als Chromseite bezeichnet, die andere sieht aus wie Glas und wir bezeichnen sie als Quarz-Seite.
2. Reinigen Sie die Maske. Nehmen Sie Aceton und Ethanol. Achten Sie darauf die Maske nicht zu zerkratzen, da diese Kratzer sonst ebenfalls mit abgebildet werden.

3. Starten Sie die Lampe und die Lüfter. Die Ventilatoren helfen, eine Überhitzung innerhalb des Hohlraums zu vermeiden, die zur Verdampfung der Flüssigkeiten führen würde.
4. Belichten Sie die Chrom Seite der Maske für 5 Minuten. Dieser Schritt sorgt für eine teilweise Aktivierung der Maske, welche das Chrom mehr hydrophil macht, was für den nächsten Schritt wichtig wird.
5. Nehmen Sie die Maske von der Lampe und lassen Sie sie abkühlen. Tropfen Sie einen 4,5µl großen Tropfen deionisiertes Wasser in die Mitte jeden Abschnitts, den Sie reproduzieren möchten.
6. Legen Sie das Deckglas auf das Tröpfchen. Die PEG Seite sollte Kontakt mit dem Chrom haben.
7. Drücken Sie mit einer Plastikpipettenspitze auf das Deckglas, um überschüssiges Wasser und eingeschlossene Luftblasen zu entfernen. Aufgrund der geringen Menge Wasser wird das Deckglas auf der Maske kleben bleiben.
8. Setzen Sie die Maske mit den anhaftenden Deckgläsern in das Beleuchtungssystem, diesmal die Quarz Seite dem Licht zugewandt.
9. Belichten Sie die Maske für 6 Minuten.

Filling the holes with adhesive molecules

Now that the PEG has been removed from the coverslip in the desired shapes, the “holes” in the PEG layer have to be filled with an adhesive protein with which cells will interact.

1. Take the mask out of the illumination chamber.
2. Pipette around 1mL of water around each coverslip. The water will slowly enter between the mask and the coverslip, allowing the coverslip to gently detach from the mask.
3. During this time, prepare a Petri dish cover with Parafilm (just place the parafilm in the cover). Place 40 µL droplets of fibronectin for each coverslip.
4. Once the coverslip floats on top of the given 1mL drop, lift it gently with a tweezer. Pay attention not to touch the chrome with the tweezer in order not to destroy it. If unsure, add more water to lift the coverslip higher.
5. Remove the excess of water from the coverslip and lay the coverslip on the fibronectin, PEG side against the fibronectin.
6. Let incubate for one hour.

Befüllen der Löcher mit adhesiven Molekülen

Nun, da das PEG vom Deckglas in den gewünschten Formen entfernt worden ist, müssen die "Löcher" in der PEG-Schicht mit einem adhesiven Protein gefüllt werden, mit dem die Zellen interagieren können.

1. Nehmen Sie die Maske aus der Beleuchtungskammer.

2. Pipettieren Sie rund 1 ml Wasser um jedes Deckglas. Das Wasser wird langsam zwischen die Maske und das Deckglas treten, so dass sich das Deckglas vorsichtig von der Maske löst.
3. Bereiten Sie gleichzeitig dazu den Deckel einer Petrischale mit Parafilm vor (Parafilm in Deckel legen). Geben Sie für jedes Deckglas ein 40 µl Tröpfchen Fibronektin darauf.
4. Sobald das Deckglas über dem angegebenen 1 ml Tropfen schwebt, heben Sie es vorsichtig mit einer Pinzette an. Achten sie darauf, das Chrom nicht mit der Pinzette zu berühren, damit es nicht kaputt geht. Wenn Sie unsicher sind, fügen Sie mehr Wasser hinzu um das Deckglas höher zu heben.
5. Entfernen Sie das überschüssige Wasser von dem Deckglas und legen Sie das Deckglas auf das Fibronektin, mit der PEG Seite auf das Fibronektin.
6. Lassen Sie alles für ca 1h im Inkubator.

Mounting the cell chamber

In order to study cells a sample in a form of a Petri dish is preferable to ensure cells having enough nutrients in their surroundings. To that end, the coverslips are mounted on a magnetic chamber which prevents leakage of the cell medium while being compatible with optical microscopy.

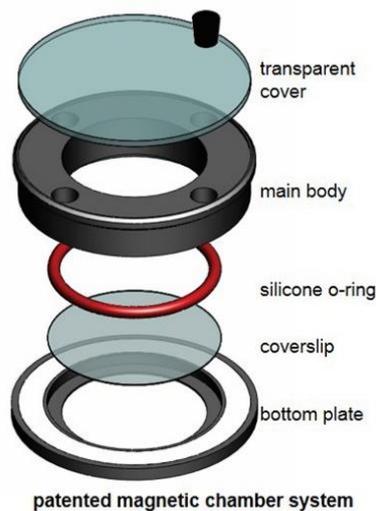


Figure 2. Scheme of a magnetic petri dish (from Chamlide website)

Bild 2. Schema einer magnetischen Petrischale (von Chamlide website)

1. To mount the chamber, follow the scheme presented on Figure 1.
2. Bring the chamber in the cell culture room and, while working under the hood, fill the chamber with phosphate buffer saline (PBS).
3. Aspirate the PBS and replace it with 1mL cell culture medium.
4. Place all the chamber together in a Petri dish that has been previously wiped with a 70% ethanol in water solution.
5. Place the Petri dish in the cell incubator.

Montage der Zellkammer

Für Zelluntersuchungen bevorzugt man die Probe in einer Petrischale, um sicherzustellen, dass die Zellen ausreichend Nährstoff in ihrer Umgebung haben. Zu diesem Zweck werden die Deckgläser auf einer Magnetkammer montiert, die das Auslaufen des Zellmediums verhindert. Diese Kammer ist mit optischer Mikroskopie kompatibel.

1. Um die Kammer zu montieren, folgen Sie dem Schema, dargestellt in Fig. 2.
2. Bringen Sie die Kammer in den Zellkulturraum und füllen Sie sie unter der Haube mit Phosphatpufferlösung (PBS).
3. Saugen Sie das PBS ab und ersetzen Sie es durch 1 ml Zellkulturmedium.
4. Legen Sie die gesamte Kammer in eine Petrischale, die zuvor mit 70% Ethanol (in Wasser gelöst) ausgewischt worden ist.
5. Stellen Sie die Petrischale in den Zellinkubator.

Cell staining, recovery, counting and seeding

1. Aspirate the medium of the cell culture dish with the aspiration system.
2. Give 1 mL PBS in the flask to rinse the remaining medium and aspirate it.
3. Add 1 mL of Trypsin to the cell and place the flask in the incubator for 3 minutes.
4. During that time prepare a tube of medium which will be used for the experiment: add 10 mL of medium in the tube and add Hoechst staining (a fluorophore that binds to DNA to make nuclei fluorescent) at a concentration of 50 ng/mL. Stock solution is at 100 mg/mL.
5. Check that cells in the flask are detached, knock the flask gently if necessary.
6. Add 1 mL of medium in the flask to stop the action of trypsin. Aspirate the liquid in the cell flask and do several back and forth movements of the liquid to unstick cells which are still attached. During that step be cautious not to form bubbles.
7. Transfer the liquid (cell + trypsin + medium) in a 10 mL tube.
8. Prepare the Malassez-counting cell and deposit 20 μ L of the cell solution in one chamber. Calculate the concentration of the cells.

A Malassez cell is composed of a grid of 25 rectangles of 20 cases (see scheme 2). In order to count a cell solution, count the amount of cells in 10 rectangles. Multiply this number by 10 and you have a number of cells per μ L.

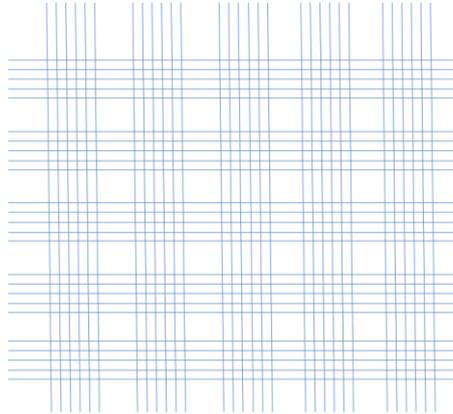


Figure 3. Scheme of a Malassez chamber

Bild 3 : Shema einer Malassez Kammer

9. Centrifuge the tube for 3 minutes at 1300 rpm.
10. Aspirate the liquid above the cell pellet that has formed at the bottom of the tube. Be careful not to aspirate the pellet itself!
11. Suspend the pellet in the prepared medium. Put as much medium as needed to obtain a final concentration of cells of 30 000 cells per mL. If necessary, make 2 successive dilution.
12. Aspirate the medium from the chambers.
13. Give 1 mL (=30 000 cells) of cell solution in every chamber. Close the lid and store all chambers back in the incubator.

The cells will need some time to adhere and spread on the patterns. 3 hours should be enough.

Zellfärbung, Rückgewinnung, Zählen und Aussaat

1. Saugen Sie das Medium von der Zellkulturschale mit dem Absaugsystem ab.
2. Geben Sie 1 ml PBS in den Behälter, um das verbleibende Medium weg zu spülen und saugen Sie es ab.
3. Geben sie 1 ml Trypsin zu den Zellen und stellen Sie den Behälter für 3 Minuten in den Inkubator.
4. Bereiten Sie in dieser Zeit ein Röhrchen Medium vor, welches für das Experiment verwendet wird: Pipettieren Sie 10 ml Medium in ein Röhrchen und fügen Sie den Hoechst-Farbstoff (ein Fluorophor, das an DNA gebunden Kerne fluoreszent macht) in einer Konzentration von 50 ng / mL hinzu. Die Stammlösung liegt in einer Konzentration von 100 mg / mL vor.
5. Überprüfen Sie, ob sich die Zellen im Behälter bereits ablösen, klopfen Sie ansonsten den Behälter – falls nötig – vorsichtig.
6. Geben sie 1 ml Medium in den Behälter, um die Wirkung des Trypsins zu stoppen. Nehmen Sie die Flüssigkeit auf und pipettieren Sie diese mehrmals auf und ab um

Zellen, welche noch ankleben, loszulösen. Seien Sie während dieser Schritte vorsichtig, damit sich keine Blasen bilden.

7. Füllen Sie die Flüssigkeit (Zellen + Trypsin + Medium) in ein 10 ml-Röhrchen.
8. Bereiten Sie die Malassez-Zählkammer vor und geben sie 20 μ l der Zelllösung in eine Kammer. Berechnen sie die Konzentration der Zellen.

Ein Malassez Zelle besteht aus einem Gitter von 25 Rechtecken, welche jeweils aus 20 Kästchen bestehen (siehe Bild 3). Um eine Zelllösung zu zählen, zählen sie die Anzahl der Zellen in 10 Rechtecken. Multiplizieren Sie diese Zahl mit 10 und Sie haben die Zahl von Zellen pro Mikroliter.

9. Zentrifugieren Sie das Röhrchen für 3 Minuten bei 1300 rpm.
10. Saugen Sie die Flüssigkeit über dem Zellpellet ab, welches sich am Ende des Rohres gebildet hat. Achten Sie darauf *nicht* das Pellet selbst wegzusaugen!
11. Lösen Sie das Pellet in dem vorbereitete Medium. Setzen Sie so viel Medium hinzu, dass Sie eine Endkonzentration von 30 000 Zellen pro ml erhalten. Falls erforderlich, verdünnen Sie 2 mal aufeinanderfolgend.
12. Saugen Sie das Medium von den Kammern ab.
13. Geben Sie 1 ml (= 30 000 Zellen) der Zelllösung in jede Kammer. Schließen Sie den Deckel und stellen Sie alle Kammern zurück in den Inkubator.

Die Zellen werde einige Zeit brauchen um auf den "pattern" zu adherieren und sich auszubreiten. 3 Stunden sollten genügen.

Imaging cells

The samples will be imaged with a 20 x objective in order to have an optimum between the resolution and the number of cells. You will need to take images of cells in bright field and in fluorescence in order to image microtubules and cell nuclei.

During that step you will take as many pictures as possible. There are 4 different patterned shapes. For each shape you need to have a good amount of cases in order to be statistically relevant for the analysis.

Data Analysis

The main goal of the analysis is to detect on each image the nucleus and the centrosome of each cell and to bring them in relation to the shape of the pattern.

To perform the analysis, the open source software FIJI (Fiji Is Just ImageJ) will be used. The flow of the analysis is:

1. Open the image with its three channels of color.
2. Choose an orientation of the image and rotate it in a direction you will be able to explain. For example, in the case of ellipses, you may choose the orientation of the long axis.
3. Work with the LUT to see how you can play with the contrast and brightness for each color.

4. Specifically on the red channel (microtubule), use the thresholding tool in order to only see the most intense spot which represents the centrosome.
5. Using the line and measure tools, find the direction of the axis going from the center of the nucleus to the centrosome.
6. Represent your results in an understandable manner, showing a comparison for each geometry of pattern, as well as the statistics of this representation. The different possibilities will be discussed during the analysis.

Abbilden von Zellen

Die Proben werden mit einem 20 x Objektiv aufgenommen, um ein Optimum zwischen der Auflösung und der Anzahl von Zellen aufzunehmen. Um Bilder von Mikrotubuli und Zellkernen zu erhalten, benötigen Sie Bilder von Zellen in Brightfield- und in Fluoreszenz.

Während dieses Schrittes sollten Sie so viele Bilder wie möglich machen. Es gibt 4 verschiedene strukturierte Formen. Für jede Form benötigen Sie eine gute Anzahl, um für die Analyse statistisch relevant zu sein.

Datenanalyse.

Das Ziel der Analyse ist es, auf jedem Bild den Kern und das Zentrosom jeder Zelle zu erfassen und sie in Beziehung zu der Form des Musters zu bringen. Um diese Analyse durchzuführen, wird die Open-Source-Software FIJI (*„Fiji is just ImageJ“*) verwendet.

Der Verlauf der Analyse ist der Folgende:

1. Öffnen Sie das Bild mit seinen drei Farbkanälen.
2. Wählen Sie eine Orientierung des Bildes und drehen Sie es in eine Richtung, die Sie erläutern können. Zum Beispiel könnten Sie im Fall von Ellipsen möglicherweise die Orientierung der langen Achse wählen.
3. Arbeiten Sie mit der LUT, um zu sehen, wie Sie den Kontrast und die Helligkeit für jede Farbe bearbeiten können.
4. Verwenden Sie insbesondere das Schwellenwert-tool beim roten Kanal (Mikrotubuli) so, dass Sie nur den stärksten Spot (das Zentrosome) sehen.
5. Finden Sie die Achse vom Kernzentrum zu den Zentrosomen mit Hilfe des Linien und Mess-tools.
6. Stellen Sie Ihre Ergebnisse in einer verständlichen Art und Weise dar, wobei jede Geometrie von Mustern verglichen werden soll und die Statistik dieser Darstellungen. Die unterschiedlichen Möglichkeiten werden während der Analyse diskutiert.