

Cell biophysics practical: Migration of cells in confined channels

Fortgeschrittenen-Praktikum Biophysik: Zellmigration in mikrofluidischen Kanälen

Day 1: Experiments

Tag 1: Messungen

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.

You should come some days before your appointment to watch an introductory video presenting the experiments. They are especially explaining those experiments for which you won't have the time to do them yourself and which we have done for you beforehand.

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.

Wir bitten Sie, sich vor der Experiment bei uns anzumelden, um ein Film über die Experimente zu sehen. In diesem Film werden die Experimente beschrieben, für die Sie selbst keine Zeit haben und welche wir im Voraus für Sie erledigt haben.

The goal of our experiments is to observe, characterize and compare cells migrating in confined environment.

Cell migration is a way for a cell to move from a place to another. This is particularly important in many biological processes such as embryonic development, wound healing or immunity. Depending on their types, cells can move in different manners (migration mode). The two main modes studied for single cells are the mesenchymal migration and the amoeboid one.

Die Bewegung einer Zelle von einem Ort zu einem anderen wird Zellmigration genannt. Diese Migration ist besonders wichtig für viele biologische Vorgänge wie Embryonalentwicklung, Wundheilung und Immunität. Verschiedene Zelltypen haben verschiedene Migrationsmoden. Die beiden Hauptmigrationsmoden für einzelne Zellen sind Mesenchymal- oder Amöboidmigration.

For mesenchymal migration, cells need to adhere to their environment (the working surface in the case of 2D migration, or the surrounding matrix in 3D). In short, the front of the cell adhere more firmly while the rear contracts. The force produced by the rear is then transmitted to the substrate via the adhesion points, producing a net movement of the cell.

Bei der Mesenchymal-migration haften die Zellen an der Umgebung (Oberfläche für 2D oder Umgebung für 3D). Die Vorderfront der Zellen adhärirt dabei stärker als die Rückfront, welche kontrahiert. Die produzierte Kraft wird über Adhäsionspunkte an das Substrat weitergegeben. Diese Schritte erzeugen eine Bewegung.

The case of amoeboid migration is more complex and its mechanisms are not yet fully understood. Nevertheless it is clear that for this migration to occur, cells don't need to adhere and the cytoskeleton needs to be contracted at the rear of the cell. One model for this migration is to see the cell as chimney climbers (Hawkins *et al.* PRL 102 (2009)). The rear contraction produces an increase of pressure within the cell that will be transmitted as a normal force to the surroundings. The pressure from the rear is then transformed as a flow towards the front, allowing the cell to move.

In dem Fall der Amöboid-migration sind noch nicht alle Mechanismen komplett verstanden. Allerdings wissen wir, dass die betroffenen Zelltypen keine Adhäsion brauchen und dass das Zytoskelett ebenfalls an der Rückfront kontrahieren muss. Ein Modell dieser Migration beschreibt die Zellen als Kaminkletterer (Hawkins *et al.* PRL 102(2009)). Durch die Kontraktion der Rückfront steigt der Druck in der Zelle an, welcher als Kraft senkrecht zur Wand weitergegeben wird. Der Druck im hinteren Teil der Zelle wird dann in einen Fluss in den vorderen Teil der Zelle umgewandelt und die Zelle kann sich fortbewegen.

One key component of both migration modes is the need to produce a force at the rear of the cells. In both cases it is achieved by a contractile force generated by the motor protein myosin II on the cytoskeleton.

The goal of this experiment will be to assess the importance of the myosin II in the case of amoeboid migration.

Für beide Migrationsart müssen die Zellen im hinteren Teil Kraft produzieren. Diese Kraft, welche die Zelle kontrahieren lässt, wird durch Aktivität des Motorproteins Myosin II am Zytoskelett generiert.

Das Ziel dieses Experimentes ist es, die Rolle von Myosin II für amöboide Migration zu bewerten.

To achieve this we will use a new setup composed of microfabricated channels of 5 microns size (Faure-André et al. Science 322 (2008)). The molds for the channels are built through microfabrication. This step is beyond the scope of this practical and you will be given already made ones for your experiments.

Zu diesem Zweck werden wir einen neuen Aufbau aus mikrogefertigten Kanälen von 5 Mikrometer Größe benutzen (Faure-André et al. Science 322 (2008)). Die Formen für die Kanäle werden in Mikrofabrikation hergestellt. Dieser Arbeitsschritt gehört nicht zu diesem Praktikum, und Sie werden fertige Aufbauten für Ihre Experimente erhalten.

Find or draw a simple scheme presenting the principles of Soft-photolithography.

Finden oder zeichnen Sie ein einfaches Schema zur Darstellung der Prinzipien der Soft-Photolithographie.

Biophysics studies often make use of PDMS chips. PDMS is an elastomer that is easy to prepare in laboratories. It is composed of a base polymer and a crosslinker which are mixed together. This mix will harden by heat.

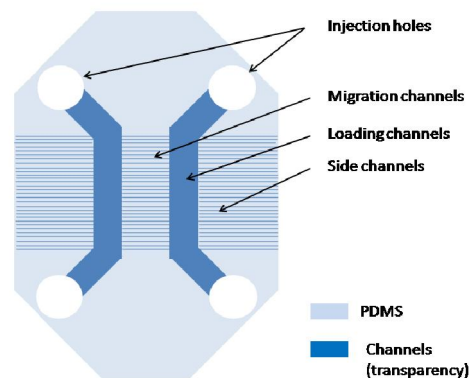
Biophysikalische Studien nutzen oft PDMS Chips. PDMS ist ein Elastomer, das in Laboren einfach genutzt werden kann. Es besteht aus einem Basis-Polymer und einem Vernetzungsmittel, die zusammengemischt sind. Diese Mischung wird durch Hitze erhärtet.

From a material point of view, what is an elastomer. Specifically for PDMS find its advantages for biophysics that makes it so widely used in biophysics.

Was ist ein Elastomer in materieller Hinsicht? Finden Sie speziell bezüglich PDMS seine Vorteile für die Biophysik, die es so vielseitig nutzbar machen.

For these experiments the microsystem used is presented on Scheme 1. This chip allows the visualization of cells migrating in short channels of 800 μm of length, and a square section of ca 5 by 5 μm . To ease the cells entry, there are two loading channels of 50 μm height on both ends of the migrating channels. Finally, side channels exit out of the chip to help cell medium to diffuse within the channels.

Für diese Experimente ist das verwendete Mikrosystem in Schema 1 dargestellt. Dieser Chip ermöglicht die Darstellung von migrierenden Zellen in kurzen Kanälen von 800 μm Länge und einer quadratischen Fläche von ca. 5 mal 5 μm . Um das Eindringen der Zellen zu erleichtern, gibt es zwei Ladekanäle von 50 μm Höhe an beiden Enden der migrierenden Kanäle. Schließlich führen Seitenkanäle aus dem Chip heraus, um dem Zell-Medium die Ausbreitung in den Kanälen zu ermöglichen.



Scheme 1 : Drawing of the PDMS chip

Schema 1: Zeichnung des PDMS-Chips

Your first task will be to create such a chip and clean it from the PDMS pieces you will be given at the beginning of the day. This corresponds to the first section of the protocol. At the end of that step you will have a PDMS piece with channels that are semi open. The next step will be then to close the channels binding the chip to a glass surface.

One advantage of the PDMS is that its surface can be easily modified. By using this property it is possible to bind it covalently to glass by plasma treatment.

Ihre erste Aufgabe wird es sein, einen solchen Chip herzustellen und von den PDMS-Stücken zu reinigen, die Sie am Tagesbeginn erhalten werden. Dies entspricht dem ersten Teil des Protokolls. Am Ende dieses Arbeitsschritts werden Sie ein PDMS-Stück mit halb offenen Kanälen haben. Der nächste Schritt wird dann darin bestehen, die Kanäle zu schließen, indem sie den Chip auf einer Glasoberfläche befestigen.

Ein Vorteil des PDMS besteht darin, dass seine Oberfläche problemlos verändert werden kann. Durch Nutzen dieser Eigenschaft ist es möglich, es durch Plasmabehandlung kovalent an Glas zu binden.

Recall the definition of a plasma. What will happen to PDMS and glass in plasma? How can they covalently bind? Best would be to provide a scheme of this process.

Denken Sie an die Definition von Plasma. Was wird mit PDMS und Glas in Plasma geschehen? Wie können sie sich kovalent verbinden? Bitte erstellen Sie ein Schemata.

In the second section of the protocol you will find the procedure to bind PDMS to glass with plasma treatment.

Before injecting the cells, the chip needs to be functionalized. Thanks to its known chemistry, PDMS can be functionalized with numerous different molecules. It is then possible for the cells to be in contact with adherent or repellent cues.

Im zweiten Teil des Protokolls finden Sie das Verfahren, wie PDMS durch Plasma-Behandlung mit Glas verbunden wird.

Vor dem Injizieren der Zellen muss der Chip funktionalisiert werden. Dank seiner bekannten chemischen Zusammensetzung kann PDMS mit zahlreichen verschiedenen Molekülen funktionalisiert werden. Dann können die Zellen mit anziehenden oder abstoßenden Markern in Kontakt kommen.

For these experiments the channels will be coated with fibronectin, a protein that specifically interacts with different integrins to form focal adhesions and promote cell adhesion. While unnecessary for amoeboid cell migration inside the channels, this coating will help the cell to reach the channels' entries. The procedure is detailed in the section 3 of the protocol.

Once the chip is ready, cells can be loaded and their migration recorded. For these experiments, you will work with activated HL60 cells. HL60 is a human cell line derived from acute promyelocytic leukemia cells. Non-activated cells are proliferating in suspension and become adherent only after activation/differentiation. These differentiated cells (similar to neutrophils=white blood cells) are able to migrate.

Für diese Experimente werden die Kanäle mit Fibronektin überzogen, einem Protein, das speziell mit verschiedenen Integrinen interagiert und damit fokale Adhäsionen bildet und die Zelladhäsion fördert. Obwohl Adhäsion für amöboide Migration selbst unnötig ist, wird diese Beschichtung den Zellen helfen, den Eingang der Kanäle zu erreichen. Das Verfahren ist in Teil 3 des Protokolls erläutert.

Sobald der Chip vorbereitet ist, können die Zellen zugegeben und ihre Migration aufgezeichnet werden. Für diese Experimente werden Sie mit aktivierten HL60-Zellen arbeiten. HL60 ist eine menschliche Zelllinie, die aus akuten promyelozytischen Leukämiezellen gewonnen wurde. Nicht aktivierte Zellen vermehren sich in Suspension und werden erst nach Aktivierung/Differenzierung anhaftend. Diese differenzierten Zellen (ähnlich Neutrophilen = weißen Blutzellen) können migrieren.

What is a cell? What is called a cell line? How do we culture cells (requirements, safety...)?

Cite at least 3 main organelles of a cell and their purpose.

What is called cytoskeleton and what are the main protein that compose it?

What are molecular motors, what's the role of Myosin II ?

Was ist eine Zelle? Was ist eine Zelllinie? Wie kultivieren wir Zellen (Anforderungen, Sicherheit ...)?

Nennen Sie mindestens 3 Hauptorganellen einer Zelle und ihren Zweck.

Was heißt Zytoskelett und welches sind die Hauptproteine, aus denen es besteht?

Was sind molekulare Motoren? Welche Rolle spielt Myosin II?

In order to record the migration of the cells in the channels, Höchst fluorescent staining will be used. This molecule binds to DNA which means it will specifically labels cell nuclei.

Once labeled the cells will be recovered from the cell culture dish and counted. They will be splitted in two sets of cells: one control condition and a second condition containing the drug Y27632 which interferes with the binding of myosin II to actin. The activity of the motor protein is hence reduced. Finally, cells for both conditions will be loaded into the channels. These steps correspond to the fourth section of the protocol.

The last step of the experiment is the recording of the migration by microscopy. To that purpose, we will use time-lapse, multi-position, and fluorescent microscopy. The procedure won't be detailed in the protocol part and will be explained during the experiments together with us.

Um die Zellmigration in den Kanälen aufzuzeichnen, nutzen wir fluoreszierendes Färbemittel (Höchst). Dieses Molekül bindet an DNA, d.h. es wird speziell Zellkerne kennzeichnen.

Sobald sie markiert sind, werden die Zellen aus der Zellkulturschale entnommen und gezählt. Sie werden in zwei Teile geteilt: ein Teil wird die Kontrollgruppe, der andere wird mit Y27632 versetzt: eine Chemikalie, die auf die Bindung von Myosin an Aktin wirkt. Die Aktivität der Motorproteine wird in dieser Gruppe reduziert. Am Ende werden die Kanäle mit beiden Zuständen gefüllt. Diese Arbeitsschritte entsprechen dem vierten Teil des Protokolls.

Der letzte Arbeitsschritt des Experiments ist die Aufzeichnung der Migration durch Mikroskopie. Dazu nutzen wir Zeitspannen-, Multipositions- und Fluoreszenzmikroskopie. Das Verfahren wird nicht näher im Protokoll erläutert; es wird während der Experimente zusammen mit uns erklärt.

Recall 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!

Denken Sie an die optische Hauptkomponente eines Mikroskops. Was heißt inverses Mikroskop?

Was ist das Prinzip der Fluoreszenz? Welches sind die Hauptprobleme bei Fluoreszenzmikroskopie in Zellen und wie können wir sie lösen? (Leider steht die Antwort nicht auf der deutsche Wikipedia- Seite, aber Sie können sie gerne hinzufügen!)

Protocol

Protokoll

Section 1: PDMS chip preparation

Teil 1: Präparation des PDMS-Chips

1. Handle PDMS pieces with care. Train yourself to identify the micro-structured side. **Gehen Sie vorsichtig mit PDMS-Stücken um. Üben Sie sich darin, die mikrostrukturierte Seite zu erkennen.**
2. Drill 4 holes with a 2.5 mm driller where they are designed to be. **Bohren Sie 4 Löcher mit einem 2,5 mm-Bohrer an den angegebenen Stellen.**
3. With a scalpel, resize the PDMS piece to fit the dish in which it will be bound. Take care not to cut through the side channels. **Bringen Sie das PDMS-Stück mit einem Skalpell auf die passende Größe für die vorgesehene Schale. Achten Sie darauf, nicht durch die Seitenkanäle zuschneiden.**
4. Use tape on the chips to remove dust and throw the chip in a tube containing 70% ethanol. **Entfernen Sie mit Klebeband Staub von den Chips und legen Sie sie in ein Reagenzglas mit 70-prozentigem Ethanol.**
5. Sonicate for 30s to 1 min the tube containing the chips to remove smaller PDMS particles that stick to the structure and in the holes. As PDMS pieces tend to stick to each other, shake regularly the tube to separate them. **Sonifizieren Sie das Reagenzglas mit den Chips für 30 s bis 1 min, um kleinere PDMS-Partikel zu entfernen, die in der Struktur oder in den Löchern haften. Da PDMS-Stücke oft aneinander kleben, schütteln Sie das Reagenzglas regelmäßig, um sie zu trennen.**
6. Recover the different chips with tweezers and dry them with a can of compressed air. **Nehmen Sie die verschiedenen Chips mit einer Pinzette auf und trocknen Sie sie mit Druckluft.**

Section 2: Plasma activation and chip binding

Teil 2: Plasma-Aktivierung und Chipbindung

1. Place the PDMS chips, microstructures up and open glass-bottom dishes on the glass stand. Place that stand within the plasma machine. **Platzieren Sie die PDMS-Chips, die Mikrostrukturen nach oben, und öffnen Sie die Glasboden-Schalen am Glasständer. Stellen Sie diesen Ständer in die Plasma-Maschine.**

2. Close the air tap of the lid. Hold it on the plasma chamber and turn the vacuum pump on. Once vacuum is made, the lid can be released. **Schließen Sie die Luftklappe des Deckels. Drücken Sie ihn an die Plasma-Kammer und schalten Sie die Vakuumpumpe ein. Sobald das Vakuum hergestellt ist, kann der Deckel losgelassen werden.**

3. After few seconds, turn the RF generator on (max power) and check the color of the plasma from the side of the machine. By carefully opening the air tap of the lid, adjust that color to pink. Once stable, activate the surface for 30 seconds. **Schalten Sie nach einigen Sekunden den RF-Generator ein (auf Maximum) und prüfen Sie die Farbe des Plasmas von der Maschinenseite aus. Durch vorsichtiges Öffnen der Luftklappe am Deckel regulieren Sie diese Farbe nach Rosa.**

4. After 30 seconds turn the RF off, open the tap and hold the lid. Turn the pump off and let air in the chamber until the lid gets loose. **Schalten Sie den RF nach 30 Sekunden aus, öffnen Sie die Klappe und halten Sie den Deckel. Schalten Sie die Pumpe aus und lassen Sie Luft in die Kammer, bis der Deckel sich lockert.**

5. Take the samples out of the chamber and put both activated surfaces in contact. Be careful to not apply a high pressure on the PDMS to avoid channels deformation. **Nehmen Sie die Proben aus der Kammer und bringen Sie beide aktivierten Oberflächen in Kontakt. Achten Sie darauf, keinen zu hohen Druck auf die PDMS auszuüben, um die Verformung der Kanäle zu vermeiden.**

6. Close the dishes and place them in the oven for 30 minutes to enhance binding. **Schließen Sie die Schalen und stellen Sie sie für 30 Minuten in den Ofen, um Bindung zu fördern.**

Section 3: Coating of the channels

Teil 3: Beschichten der Kanäle

1. Place the dishes containing the chips in the vacuum jar-bell and turn the pump on. After 1 minute, close the chamber and stop the pump. Wait for 10 to 15 minutes.

Stellen Sie die Schalen mit den Chips in dem Vakuum-Exsikkator und schalten Sie die Pumpe ein. Schließen sie den Exsikator nach 1 Minute wieder und schalten Sie die Pumpe aus. Warten Sie 10 bis 15 Minuten.

2. Take the dishes under the cell culture hood.

Stellen Sie die Schalen unter die Zellkultur-Haube.

3. Pipette 10 μ L of fibronectin solution (25 μ g/mL) and add it in each entry holes of the chips as well as on the side of the chip. You should see liquid spreading in the whole structure.

Pipettieren Sie 10 μ L Fibronektin-Lösung (25 μ g/mL) und geben Sie sie in jedes Einfüllloch der

Chips und auch seitlich der Chips. Sie sollten die Ausbreitung der Flüssigkeit über die ganze Struktur sehen.

4. Keep the samples closed outside of the hood in a big plastic Petri dish for 1 hour at room temperature.

Lassen Sie die Proben für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschlossen außerhalb der Haube in einer großen Plastik-Petrischale.

5. After adsorption, under the hood, empty the holes by aspiration. Cast phosphate buffer solution (PBS) in the dish, remove the bubbles in the entry holes and aspirate immediately all the liquid.

Nach der Adsorption unter der Haube leeren Sie die Löcher durch Absaugen. Geben Sie Phosphat-Pufferlösung (PBS) in die Schale, entfernen Sie die Blasen in den Eintrittsöffnungen und saugen sofort alle Flüssigkeit ab.

6. Redo the last step but let PBS 2 minutes in the dish before aspirating. Repeat a third time. Führen Sie den letzten Arbeitsschritt noch einmal durch, aber lassen Sie PBS 2 Minuten in der Schale, bevor Sie absaugen. Wiederholen Sie das Ganze ein drittes Mal.

7. After three step of rinsing, empty the whole dish and cast culture medium in it. Half of the samples will have a normal medium while the other half will have a medium containing a special molecule. Put enough medium so that the PDMS is totally covered.

Nach dreimaligem Spülen leeren Sie die ganze Schale und geben Nährlösung hinein. Die Hälfte der Proben wird einen normalen Nährboden haben, während er bei der anderen Hälfte ein spezielles Molekül enthalten wird. Nehmen Sie genug Nährlösung, so dass das PDMS vollständig bedeckt ist.

8. Place the dishes in the big Petri dish in the cell incubator. Stellen Sie die Schalen in die große Petrischale im Zell-Inkubator.

Section 4: Cell staining, recovery, counting and seeding

Teil 4: Einfärbung, Entnahme, Zählung und Platzierung der Zellen

1. Add 5 µL of Hoechst solution in two wells of the plate containing the cells. Replace the plate in the incubator for 30 minutes.

Geben Sie 5 µL Hoechst-Lösung in zwei Mulden der Zellplatte. Stellen Sie die Platte wieder für 30 Minuten in den Inkubator.

2. With a 1 mL pipette, aspirate the liquid of one well and do several back and forth movements of the liquid to unstick attached cells. During that step be cautious to not form

bubbles. Put the cell solution in a first tube. Redo this step for the second well and fill a second tube.

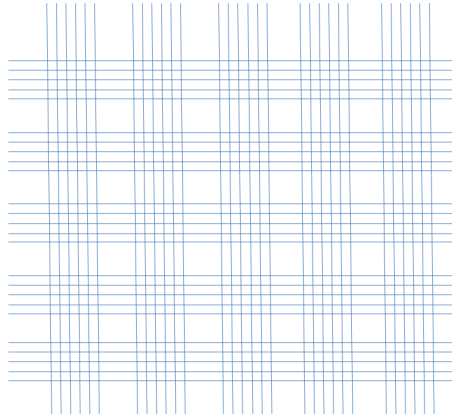
Saugen Sie mit einer 1 mL-Pipette die Flüssigkeit von einer Mulde und bewegen Sie sie vor und zurück, um aneinanderhaftende Zellen zu trennen. Achten Sie bei diesem Vorgang darauf, Blasenbildung zu vermeiden. Lassen Sie die Zell-Lösung in einem Röhrchen. Wiederholen Sie den selben Schritt mit der zweite Mulde und füllen Sie ein zweites Röhrchen.

3. Prepare the Malassez for the counting of cells and deposit 20 μL of a cell solution in one chamber. Calculate the concentration of cells.

Bereiten Sie den Malassez für die Zellzählung vor und füllen Sie 20 μL einer Zelllösung in eine Kammer. Berechnen Sie die Zellkonzentration.

Malassez cell is composed by 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 the number of cells per μL .

Eine Malassez-Zelle besteht aus einem Netz mit 25 Rechtecken aus 20 Feldern (siehe Abbildung 2). Um eine Zelllösung zu zählen, zählen Sie die Menge der Zellen in 10 Rechtecken. Multiplizieren Sie diese Zahl mit 10, und Sie erhalten die Anzahl der Zellen per μL .



Scheme2Malassezcell

Abbildung 2 Malassez-Zelle

4. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 1200 rpm.

Zentrifugieren Sie die Reagenzgläser 5 Minuten bei 1200 rpm.

5. Aspirate the liquid above the cell pellet that has formed at the bottom of the tube. Be careful not to aspirate the pellet itself!

Saugen Sie die Flüssigkeit über dem Zellpellet ab, das sich am Boden des Reagenzglases gebildet hat. Achten Sie darauf, nicht das Pellet selbst anzusaugen!

6. Resuspend the pellet in the correct medium (normal medium for the first pellet and medium containing the Y27632 for the second pellet). Put as much medium as needed to obtain a final concentration of cells of 15 million per mL.

Resuspendieren Sie das Pellet in die richtige Nährlösung (normale Lösung für das erste Pellet und Lösung mit Y27632 für das zweite Pellet). Nehmen Sie so viel Lösung wie nötig, um auf eine Zellkonzentration von 15 Millionen per mL zu kommen.

7. Take samples out of the incubator and lower the level of medium below the level of PDMS and empty the entry holes.

Nehmen Sie Proben aus dem Inkubator und senken Sie den Stand der Lösung unter das Niveau des PDMS und leeren Sie die Einfülllöcher.

8. Push 10 mL of cell solution in both entries of one single loading channel, letting the other two entries empty. This step creates a pressure difference which helps to drive the cells in front of the migrating channels.

Drücken Sie 10 mL Zelllösung in beide Öffnungen eines einzelnen Befüllkanals und lassen Sie die beiden anderen Öffnungen leer. Dieser Vorgang erzeugt einen Druckunterschied, der dazu beiträgt, die Zellen vor die migrierenden Kanäle zu schieben.

9. Check on the microscope that enough cells are in front of the migrating channels and recover the entire chip with medium.

Überprüfen Sie im Mikroskop, ob genug Zellen vor den migrierenden Kanälen sind, und bedecken Sie den ganzen Chip mit Nährlösung.

Now your cells are ready to be imaged on the microscope. This step will be shown and explained directly on site on the day of the experiment. Cells will be observed and recorded overnight.

Jetzt können Ihre Zellen unterm Mikroskop dargestellt werden. Dieser Arbeitsschritt wird am Tag des Experiments direkt vor Ort gezeigt und erklärt. Die Zellen werden über Nacht beobachtet und aufgezeichnet.

Planned timing of steps:

- Chip preparation (45 min)
- Assembly and oven (1h, 20 min for mixing incl.)
- Vacuum and coating (30 min +1h coating: lunch)
- Rinsing, medium, cell staining (20+30+30)
- Cell recovery and counting (30 min)
- Seeding (20 min +30 min for entry)
- Microscopy (1hour)

Vorgesehene Zeiteinteilung der Arbeitsschritte:

- Chippräparation (45 min)
- Aufbau und Ofen (1h, 20 min inkl. Mischen)
- Vakuum und Beschichten (30 min +1h Beschichten: Mittagspause)
- Spülen, Nährlösung, Zelleinfärbung (20+30+30)
- Zellentnahme und -zählung (30 min)
- Platzierung (20 min +30 min zur Befüllung)
- Mikroskopie (1h)

Day 2: Data Analysis

Tag 2: Datenanalyse

In this 2nd part of the practical you will develop and discuss representative figures and statistical analysis of your data starting from images taken with the microscope the night before. Therefore, you will follow certain steps along which we have prepared some more questions. Please remember to give the source of your information when you prepare the answers of those questions.

Image analysis will be accomplished by the free software ImageJ, Statistics and Data representation will be performed in Origin. Both programs are available on a PC in the AG Lautenschläger which can be used at 100% at day 2 of the practical and if necessary on additional days in agreement with the group. These programs will be sufficient to analyze manually the measured data. If there is spare time and interest, students are invited to write a small analysis programs to make data analysis more efficient.

We will assist you with the following steps for the first 5 cells. After this, you will repeat the steps yourself until your dataset is large enough to get a statistical answer.

Can we theoretically reach a number of measurements which allows to be sure of our conclusions? How do we deal with this is practically?

In diesem zweiten Teil des Praktikums werden Sie repräsentative Abbildungen und statistische Analysen Ihrer Daten entwickeln und diskutieren, beginnend mit den per Mikroskop gewonnenen Bildern der vorigen Nacht. Dazu werden Sie nach bestimmten Schritten vorgehen, für die wir weitere Fragen vorbereitet haben. Denken Sie bitte daran, Ihre Informationsquelle anzugeben, wenn Sie die Antworten auf diese Fragen vorbereiten.

Die Bildanalyse wird mit der freien Software ImageJ durchgeführt, Statistik und Datendarstellung mit Origin. Beide Programme sind in einem PC der AG Lautenschläger verfügbar, der zu 100% an Tag 2 des Praktikums genutzt werden kann, wenn nötig, auch an zusätzlichen Tagen nach Absprache mit der Gruppe. Diese Programme reichen aus, um die gemessenen Daten manuell zu analysieren. Wenn darüberhinaus Zeit und Interesse besteht, können die Studierenden gerne ein kleines Analyseprogramm schreiben, um die Datenanalyse effektiver zu machen.

Wir werden Ihnen mit den folgenden Schritten bei den ersten 5 Zellen helfen. Anschließend wiederholen Sie die Schritte selbstständig, bis Ihr Datensatz groß genug für eine statistische Auswertung ist.

Gibt es ein theoretische Anzahl von Messungen, mit dem man sicher sein kann, dass ein Ergebnis richtig ist? Wie geht man praktisch vor?

Workflow day 2:

Arbeitsschritte Tag 2:

1. Data transfer from microscope to PC

Datentransfer von Mikroskop zu PC

This step can take up to one hour. In the meantime, discuss the following questions with the person supervising the practical:

Dieser Schritt kann bis zu einer Stunde dauern. Diskutieren Sie in der Zwischenzeit die folgenden Fragen mit dem Praktikumsbetreuer:

An image is a matrix of values. The intensity measured by each pixel of the camera is expressed as an intensity level compromised in a range depending on the image depth. This depth determines the size of the image once recorded on a computer, and a good balance between file size and intensity resolution has to be found.

How are sizes of objects calibrated in images? What is a kymograph and what is it used for?

Further on, get familiar with ImageJ.

(open, close, save, measure parameters, set scale bar, build movies out of a series of images, generate a kymograph)

Ein Bild ist eine Matrix von Größenwerten. Die Intensität von jedem Pixel der Kamera wird als ein Intensitätsniveau angegeben. Dieses Niveau steht in einer Skala, die von der Bildtiefe abhängt. Diese Tiefe bestimmt die Größe des Bildes, wenn es auf dem Computer gespeichert ist. Man sollte einen guten Kompromis zwischen Datengröße und Intensitätsauflösung finden.

Wie sind die Größen auf einem Bild kalibriert? Was ist ein Kymograph und wozu dient er?

Machen Sie sich des Weiteren mit ImageJ vertraut.

(Öffnen, schließen, speichern, Parameter messen, eine Maßstableiste setzen, Filme aus einer Bilderserie erstellen, einen Kymographenerstellen.)

2. Assembly of movies

Filmmontage

Assemble one movie per microscope position (on each position you will have several cells to analyze)

Montieren Sie einen Film per Mikroskop-Position (auf jeder Position werden Sie mehrere Zellen zu analysieren haben).

3. Generation of one kymograph for each movie for following analysis.

Erstellung eines Kymographen für jeden Film zu folgender Analyse

Generate one representative kymograph with a scalebar for your report.

In the kymographs, you will see a different behaviour of movement for each cell. For the sake of simplicity, you will measure the velocity of the cells exhibiting a long straight migration without touching any other cells. Nevertheless, it is important to know how representative of the population those cells are.

Present your results as a table containing for each analyzed kymograph:

- how many cells there are in total
- From this total, how many exhibit a change in direction.
- How many cells did you measure
- From the measured cells, how many have changed direction

What is called persistence in cell migration ?

Erstellen Sie einen repräsentativen Kymographen mit einer Maßstableiste für Ihr Protokoll.

In jedem Kymographen werden Sie verschiedene Verhaltensweisen einzelner Zellen beobachten. Um dies zu vereinfachen, werden Sie nur die Geschwindigkeiten messen, welche von Zellen mit einer langen, linearen Trajektorie stammen. Diese Zellen sollten keine anderen Zellen berühren. Natürlich ist es trotzdem wichtig zu wissen, wie repräsentativ die Zellpopulation ist.

Stellen Sie ihre Ergebnisse als eine Tabelle mit den folgenden Eigenschaften dar:

- Wieviel Zellen gibt es insgesamt
- Von dieser Zahl, wieviel ändern am mindestens einmal ihre Richtung
- Wieviel Zellen haben Sie gemessen
- Von den gemessenden Zellen, wieviel ändern ihre Richtung.

Was nennt man Migrationspersistenz?

4. Statistics

Statistik

Use Origin to measure a mean value with standard error of cell speed for both cell populations. Illustrate the distribution of single cell speed for each population as well as the mean value. Try at least two different plot types and discuss advantages or disadvantages.

Perform a t-test in order to test of differences between both cell populations.

What is a t-test?

Under which conditions a t-test can be performed?

Which are the alternatives?

Benutzen Sie Origin, um einen Mittelwert mit Standardfehler der Zellgeschwindigkeit für beide Zellpopulationen zu messen. Zeigen Sie sowohl die Verteilung der Einzelzellgeschwindigkeit für jede Population als auch den Mittelwert. Probieren Sie schließlich zwei Plot-Typen und diskutieren Sie Vor- oder Nachteile.

Führen Sie einen T-Test durch, um Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen zu untersuchen.

Was ist ein T-Test?

Unter welchen Bedingungen kann ein T-Test durchgeführt werden?

Welches sind die Alternativen?

5. Adjust number of measured cells if necessary.
Ändern Sie die Zahl der gemessenen Zellen, wenn nötig.
6. Interpretation of data

Interpretation der Daten

Summarize the experiment, your expectations of data and the actual results you obtained. Is the cell speed of the two populations different? If yes or no: what might be a possible explanation? What is the drug/molecule doing within the cell and how can this explain the data you got? Try to find references in Literature to support your results.

Fassen Sie das Experiment zusammen, Ihre Datenerwartungen und die tatsächlichen Ergebnisse, die Sie erhalten haben. Ist die Zellgeschwindigkeit der beiden Populationen unterschiedlich? Wenn ja oder nein: Was könnte eine mögliche Erklärung sein? Was tut das Medikament/das Molekül in der Zelle und wie kann dies die Daten erklären, die Sie erhalten haben? Versuchen Sie, Literaturhinweise zu finden, um Ihre Ergebnisse zu untermauern.

Possible sources to help answering your questions:

Molecular Biology of the Cell by Bruce Alberts *et al.*

www.wikipedia.com (in German AND English)

Mögliche Quellen für Ihre Antworten:

Molecular Biology of the Cell by Bruce Alberts *et al.*

www.wikipedia.com (auf Deutsch UND Englisch)

Guidelines for report:

Don't forget to answer each question!

Organize the text in different sections.

Don't forget scale bars (for example in kymograph).

Leitfaden zur Auswertung :

Vergessen Sie nicht alle Frage zu beantworten.

Teilen Sie den Text in verschiedene Unterteile auf.

Vergessen Sie nicht die Skalen (z.Bin den Kymographen)