

Fortgeschrittenen-Praktikum Biophysik: Zellpolarität

Vorwort: Am Ende der Anleitung finden Sie einige Fragen, die Sie als Vorbereitung durchdenken und so gut wie möglich bearbeiten sollen. Wir stellen Ihnen einige Literaturvorschläge bereit, die Ihnen beim Beantworten der Fragen behilflich sein können. Sie werden dennoch auch weitere Literatur benutzen müssen. Die Antworten zu den vorbereitenden Fragen (inklusive Quellenangaben) sollen später in der ausformulierten Auswertung wieder auftauchen.

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.

Einleitung

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 eine Richtung erfolgt. Zu diesem Zweck haben Darmzellen eine dedizierte anisotrope Organisation und Geometrie: sie sind polar.

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.

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).

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.

Mikrostrukturierung

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 weg kommen. 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 nicht haftend gemacht.

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.

Tiefes-UV Mikrostrukturierung

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 Protein-abweisend, sodass die Zellen an keinem Punkt anhaften können. Diese funktionalisierte Oberfläche wird dann tiefes-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. Abbildung 1 beschreibt das letzte Versuchsstadium dieses Versuches.

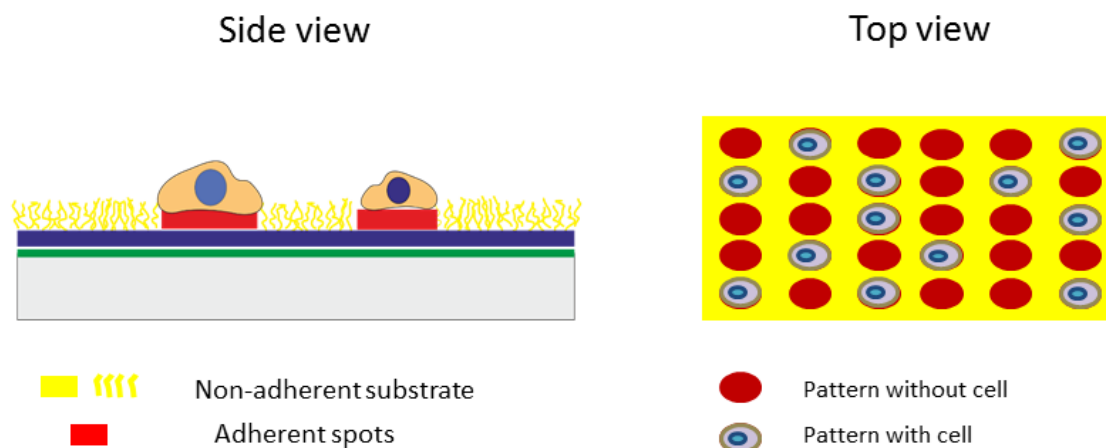


Abbildung 1: Drauf- und Seitenansicht einer mikrostrukturierten Oberfläche mit Zellen, welche auf einigen der Mikromuster sitzen.

Zellorganellen

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.

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 herstellen: 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-Netzwerke werden dann für den Rest des ersten Tages unter Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet.

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 Diagramm 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.

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 große Petrischale.
3. Geben Sie 40 µl-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.

Vorbereitung der Fibronectinlösung

Bevor die Deckgläser bestrahlt werden, muss die Fibronectinlösung vorbereitet werden. Das Fibronectin wird einem Carbonatepuffer (pH 8,7) gelöst. Die Stammlösung liegt in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Wir benötigen eine Konzentration von 25 µg/ml.

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. Die goldene Seite ist die Chromseite, die gläserne Seite ist die 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. Geben Sie einen 4,5 µl großen Tropfen deionisiertes Wasser in die Mitte jeden Abschnitts, den Sie eproduzieren 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.

Befüllen der Löcher mit adhäsiven Molekülen

Nun, da das PEG vom Deckglas in den gewünschten Formen entfernt worden ist, müssen die "Löcher" in der PEG-Schicht mit einem adhäsiven 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.

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. Die Bestandteile der Kammer wurden zuvor sterilisiert und dürfen daher nur unter der Haube zusammengesetzt werden.
2. Setzen Sie das Deckglas (hier coverslip) mit der Seite, auf denen die Zellen sitzen, nach oben zeigend ein. Füllen Sie die zusammengesetzte Kammer zunächst mit PBS, um zu überprüfen, ob keine Flüssigkeit austreten kann.
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.

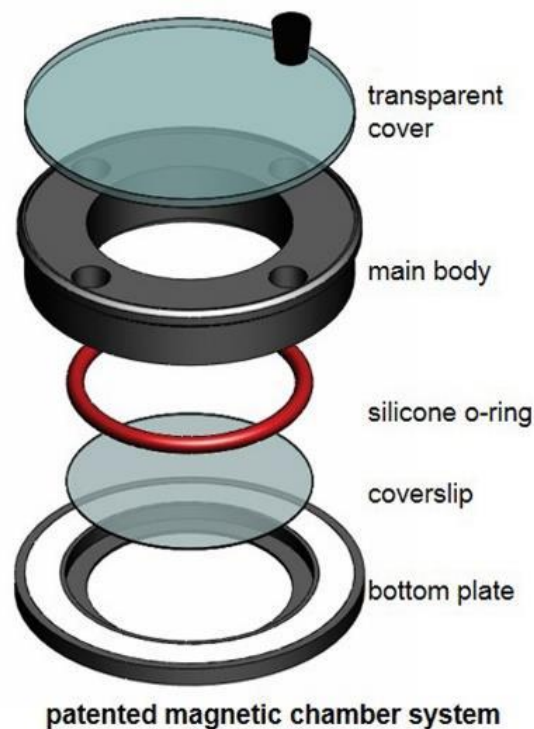


Abbildung 2: Schema einer magnetischen Petrischale (von Chamlide website).

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 wegzuspülen 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.

Eine Malassez Zelle besteht aus einem Gitter von 25 Rechtecken, welche jeweils aus 20 Kästchen bestehen (siehe Bild3). Um eine Zelllösung zu zählen, zählen sie die Anzahl der Zellen in 10 Rechtecken. Multiplizieren Sie diese Zahl mit 10^4 und Sie haben die Zahl von Zellen pro ml.

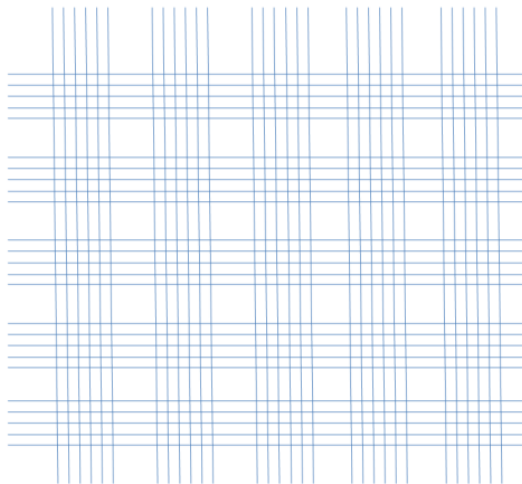


Abbildung 3: Schema einer Malassez Kammer

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 adhäreren und sich auszubreiten. 3 Stunden sollten genügen

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 (mindestens 10), um für die Analyse statistisch relevant zu sein.

Datenanalyse

Das Hauptziel dieses Versuchs ist es zu untersuchen, ob 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.

Während der Analyse soll auf jedem Bild der Kern und das Zentrosom jeder Zelle erfasst werden und in Beziehung zu der Form des Musters gebracht werden. Um diese Analyse durchzuführen, wird die Open-Source-Software FIJI („Fiji is justImageJ“) 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.

Versuchen Sie bei der Auswertung folgende Fragen zu diskutieren:

1. Wie hängt die Anordnung von Nukleus und MTOC von der Form der erzwungenen Zellform ab? Gibt es eine präferierte Ausrichtung?
2. Wo befinden sich MTOC und Nukleus relativ zur Zellmitte? Woran könnte dies liegen?
3. Versuchen Sie eine Hypothese zu formulieren, warum die Polarität des Zytoskeletts durch die erzwungene Form der Zelle beeinflusst werden könnte – oder eben nicht. (Hierbei gibt es keine richtige oder falsche Hypothese, sie sollte nur logisch mit euren Ergebnissen zusammen hängen und begründet werden.)

Vorbereitende Fragen

- 1) **Wie ist Polarität in der Physik definiert? Wie in der Biologie? Was sind Unterschiede/Gemeinsamkeiten?**
- 2) **Finden oder Skizzieren Sie ein Schema, dass die Technik der tiefen UV Mikrostrukturierung erklärt.**
- 3) **Erklären Sie kurz den Aufbau und die Funktion des Zellkerns.**
- 4) **Geben Sie eine kurze Einführung über das Zytoskelett: Welche Funktion hat es? Wie ist es aufgebaut? Was unterscheidet das „Skelett“ der Zelle von dem eines Menschen? Was sind Gemeinsamkeiten?**
- 5) **Erklären Sie nun etwas ausführlicher was Mikrotubuli sind. Wie sind sie aufgebaut? Was sind ihre Funktionen?**
- 6) **Erklären Sie das Grundprinzip der Fluoreszenz? Wie wird es in Zellen genutzt? Was könnten Probleme sein?**
- 7) **Skizzieren Sie kurz den Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. Überlegen Sie, über welche Bestandteile ein Mikroskop außerdem verfügen sollte, um Aufnahmen lebender Zellen zu ermöglichen.**
- 8) **Erklären Sie, wie Zellen adhäreren können. Erklären Sie insbesondere integrine Adhäsion und welche Bedeutung Stressfasern dabei haben.**
- 9) **Was sind morphologische Unterschiede von adhärenenten Zellen in Kultur (also unter künstlichen Lebensbedingungen in einer Zellkulturflasche) von adhärenenten Zellen im Körper? Versuchen Sie daraus abzuleiten, warum es interessant sein könnte, sich Zellen auf „micropatterns“ anzuschauen.**
- 10) **Versuchen Sie Anhaltspunkte zu finden, wie die Form der Zelle und die Organisation des Zytoskeletts zusammenhängen könnten.**

11) Berechnen Sie die benötigte Volumen der Fibronectin-Stammlösung für ein gesamt Volumen von 800 μ l.

12) Berechnen Sie das Volumen des Hoechst-Farbstoff, welches für 10 ml Medium benötigt wird.

13) Angenommen in der Malassez Zelle zählen Sie 50 Zellen. Welcher Zellkonzentration entspricht dies? In wie viel ml Medium muss das Zellpellet resuspendiert werden, um eine Konzentration von 30 000 Zellen pro ml zu erhalten?

Literaturvorschläge:

They, M. (2010). "Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions." J Cell Sci **123**(Pt 24): 4201-4213.

They, M., et al. (2006). "Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(52): 19771-19776.

Wolpert, L. (2013). "Cell polarity." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences **368**(1629): 20130419-20130419.