**FYS4720 - Lab rapport**

**Av Jonas Asperud**

**1. Introduksjon**

**2. Teori**

**Bestråling**

**-actin**

**Trådbrudd & ATM**

**p53**

**3. Metode**

Eksperimentet er del opp i to undereksperimenter, hvor metodene er litt forskjellige. Prepareringen for analyseringen var lik og har en egen seksjon.

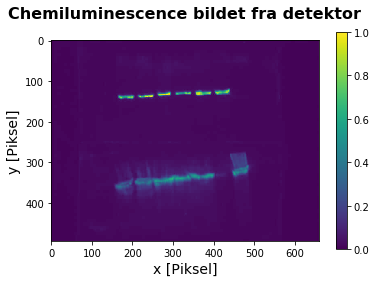
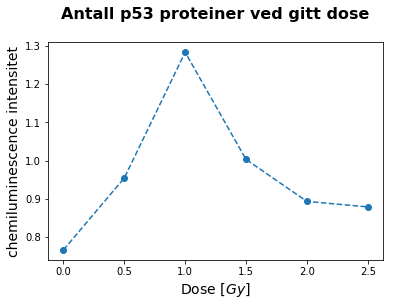
***Eksperiment 1***

***Eksperiment 2***

***Forbereding til chemiluminescence deteksjon***

**4. Resultat**

Siden resultatene fra prøvene i år ikke er så lette å tolke, velger jeg å analysere prøvene som ble gjort i fjor, 2017. Til venstre i figur 1 er bildet som ble tatt av chemiluminecsence detektoren, med relative størrelser som intensiteten. Øverst i bildet er -actin, hvor kontroll prøven er til venstre. Fra venstre til høyre øker dosen gitt til cellene som går fra 0 Gy til 2.5 Gy med 0.5 Gy intervaller. Nederst er de korresponderende p53 prøvene i samme rekkefølge. Når bildet forstørres er det mulig å se hvor grensene for p53 kan ha vært, grensene settes hvor det er et mørkt skille. Bildet ble analysert i Python hvor den totale intensiteten innenfor grensene nevnt, med en kontstant avgrensning i y-retning på bildet (50-100 px). Til høyre, i figur 2 vises intensiteten fra hver celleprøve for en gitt dose. -actin er brukt som normalisering, dvs. at den relative dose intensiteten er delt på den relative -actin intensiteten.



Figur 2 viser analysen av chemiluminescence deteksjonen. Plottet viser intensiteten ved en gitt dose som er normalisert ut ifra -actin. Det er ikke alltid et 1 til 1 forhold av chemiluminescence og antall p53, men intensiteten representerer antallet.

Figur 1 viser chemiluminescence fra prøven, hvor det er gitt forskjellige doser til forskjellige celleprøver. Til venstre er kontrollprøven uten bestråling og mot høyre er det gitt en stignde dose. Se tekst for mer informasjon. Øverst i bildet er -actin og nederst er korresponderende p53, hvor alle prøvene inkuberes i 2 timer.

I tabell 1 nedenfor er de relative intensitetene til både p53 og -actin listet, for de forskjellige stråledosene gitt til celleprøvene.

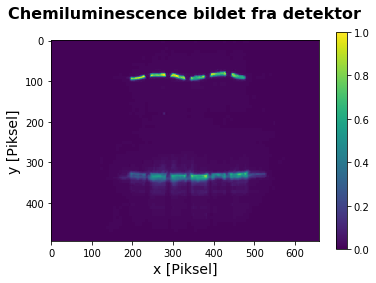
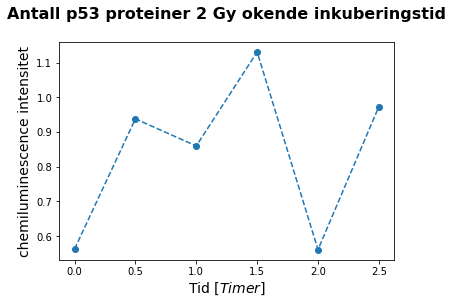
|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0 Gy | 0.5 Gy | 1.0 Gy | 1.5 Gy | 2.0 Gy | 2.5 Gy |
| -Actin | 0.82 | 0.72 | 0.78 | 0.62 | 1.0 | 0.98 |
| p53 | 0.63 | 0.69 | 1.0 | 0.63 | 0.89 | 0.86 |

Tabell 1 viser de relative intensitetene til både p53 og -actin, for de forskjellige stråledosene gitt til celleprøvene.

I eksperiment nummer to ble hver celleprøve bestrålt med 2 Gy røntgenstråling. Det ble gitt forskjellig inkuberingstid, hvor kontrollprøven ble ikke bestrålt. Prøvene fikk inkubere fra 0.5 til 2.5 timer med 0.5 timers intervaller. Fra venstre til høyre i bildet i figur 3 vises kontroll prøven først deretter med stigende inkuberingstid. Øverst i bildet er -actin og nederst er de korresponderende p53 prøvene i samme rekkefølge. Til høyre, i figur 4 vises intensiteten fra hver celleprøve for en gitt inkuberingstid. -actin er brukt som normalisering, dvs. at den relative dose intensiteten er delt på den relative -actin intensiteten.

Figur 3 viser chemiluminescence fra prøven, hvor celleprøvene ble bestrålt med 2 Gy røntgenstråler, men med forskjellig inkuberingstid. Til venstre er kontrollprøven uten bestråling og mot høyre er det stigende inkuberingstid. Se tekst for mer informasjon. Øverst i bildet er -actin og nederst er korresponderende p53.

Figur 4 viser analysen av chemiluminescence deteksjonen. Plottet viser intensiteten ved en gitt inkuberingstid som er normalisert ut ifra -actin. Det er ikke alltid et 1 til 1 forhold av chemiluminescence og antall p53, men intensiteten representerer antallet.



I

I tabell 2 nedenfor er de relative intensitetene til både p53 og -actin listet, for de forskjellige inkuberingstidene til hver celleprøvene.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Kontroll | 0.5 h | 1.0 h | 1.5 h | 2.0 h | 2.5 h |
| -Actin | 0.81 | 0.91 | 0.97 | 0.89 | 1.0 | 0.83 |
| P53 | 0.46 | 0.86 | 0.83 | 1.0 | 0.56 | 0.80 |

Tabell 2 viser de relative intensitetene til både p53 og -actin, for de forskjellige inkuberingstidene til hver celleprøvene.

**5. Diskusjon**

!!!!!!!!!!! Generelt om vårt eksperiment.

I det første eksperimentet observeres det ut i fra figur 2 at p53 antallet øker fra 0 Gy til 1.0 Gy. Dette kan komme av at det skjer flere brudd i DNAet. ATM finner bruddet og som respons blir det dannet p53 som kan stoppe cellesyklusen slik at cellen kan gis et forsøk i å reparere skaden. Grunnen til at det observeres et større antall p53 ved 1.0 Gy enn 0.5 Gy kan være at ikke alle celler får et trådbrudd ved 0.5 Gy, evt. At et større antall celler klarer å reparere seg selv innen de to timene som ble gitt til inkubering.

Ved økende stråledose observeres det at det er en synkende trend i antall p53. Det kan komme av at p53 har avgjort at skadene er for store og at det er bedre at cellen tar «selvmord», apoptose. !!!!!!!!!!! Fra teoridelen kan vi se at ved økende bestråling gir en synkende overlevingsrate, «Kanskje noe om target teori??» og det stemmer ganske bra med dette. Det er allikevel på et p53 høyt nivå, noe som observeres ut i fra kontroll prøven, som betyr at ikke alle cellene begikk apoptose. Det kan allikevel hende at cellene ble inaktivert, noe som ikke kan tolkes ut ifra dette eksperimentet.

I det andre eksperimentet observeres det ut i fra figur 4 at det utrykkes et økende antall p53 proteiner med stigende inkuberingstid, frem til 1.5 timer. !!!!!!!!!!! Dette kommer av at p53 er en sen-respons reaksjon, det tar litt tid før p53 antallet vokser. Deretter fra 1.5 til 2.0 timer synker p53 antallet igjen. Dette kan tenkes å være av samme grunn som i eksperiment 1: Det kan komme av at p53 har avgjort at skadene er for store og at det er bedre at cellen tar «selvmord», apoptose. Men fra 2.0 til 2.5 timer så øker p53 antallet kraftig. !!!!!!!!!!! Dette ser underlig ut, det som ble forventet var å se et synkende p53 antall. Det kan ha vært en eksperimentell feil, som f.eks. at dose intensiteten ved 2.0 timers inkubering er litt for lav og at -actin intensiteten ved 2.5 timers inkubering er litt for lav. Dette gjør at, i figur 4, 2.0 timer er litt for lav og 2.5 timer er litt for høy. Hvis disse justeringene gjøres kan trenden som forventes muliges ses. Dette kan forekomme, som skjedde i vårt eksperiment, når litt av væsken ikke treffer i SDS page gelen.

**6. Konklusjon**