**Resultaten Celbiologie – OV**

**Data acquisitie**

De studenten tellen (mbv software: Image J) op de foto’s per conditie:

- type 1 cellen: het aantal cellen met GFP-signaal in de nucleus

- type 2 cellen: het aantal cellen met GFP signaal in de nucleus èn in het cytoplasma

- type 3: het aantal cellen met GFP signaal in het cytoplasma

ImageJ telt het totaal aantal cellen per type op en deze data kan worden geëxporteerd in Excel. Vervolgens bepalen ze in Excel de percentages t.o.v. het totaal aantal getelde cellen (dus nucleus + nucleus&cytoplasma (partieel) + cytoplasma = 100%)

**Data analyse**

**Z-factor**

Z-factor berekenen (is op basis van de gemiddelden en standaard deviaties van de positieve (100 nM cortisol) en negatieve controle (niets toegevoegd) van data van de hele zaal.

**Grafieken + statistiek**

Iedere student berekent data van ‘eigen’ experimentele conditie.

Per student in verslag: 4 grafieken van alle condities

Statistiek per grafiek: MANOVA + post-hoc Tukey’s HSD 🡪 dit doen de studenten in het practicum in R. De assistenten helpen hierbij: er is (HOERA met dank aan Boris) een script voor MANOVA geschreven in R. De MONAVA is noodzakelijk als we willen bepalen of er een significant verschil is tussen de 3 getelde ‘celtypen’ en de experimentele conditie (zie onderstaande grafieken gemaakt door Linda). Boris heeft het script uitgebreid en de studenten krijgen van hun eigen experimentele als output een grafiek. Ze hoeven dus alleen van de andere condities een tabel te maken. Handige studenten kunnen dit script dus ook gebruiken om grafieken te maken voor de andere experimentele condities.

Grafiek maken: in exel

**Data**

Voorbeeldgrafieken (met fictieve data, zonder statistiek):

**VOORBEELD DISCUSIEPUNTEN**

Hieronder zijn een aantal mogelijke discussiepunten waar studenten op kunnen komen. Het is de bedoeling dat studenten in de discussie minimaal één methodologische (past goed bij de z-factor) en één inhoudelijke verklaring (past goed bij de experimentele condities). Als docent is het de bedoeling om de studenten eigenaar te laten van de proef. Het is dus niet de bedoeling om de studenten te sturen op alle mogelijke discussiepunten, laat dat aan henzelf over. Belangrijk is dat zij hun discussiepunten zo helder verwoorden dat jij het begrijpt.

Mocht er echter tijdens de werkbespreking in de ABV groep over een bepaalde figuur geen enkel discussiepunt ontstaan door de studenten, dan heb je door dit document een idee in welke richting je de studenten vragen zou kunnen stellen om ze een beetje te sturen.

**Z’ factor:**

Hoe de Z’ factor te interpreteren? Wat betekent de gevonden waarde en wat betekent dit dan voor de gevonden resultaten? (hiervoor kunnen ze de tabel gebruiken die ze hebben gekregen in het document Z factor berekenen).

1) Als blijkt dat de Z’ factor <0,5 is, dan is de assay dus niet robuust genoeg. Dull  *et al*  heeft laten zien dat hun assay met een fluorescent ER-GR wel robuust was. In de terugkoppeling naar de eerdere bevindingen kunnen de studenten dit dus benoemen. Bij de evaluatie/verklaringen kunnen ze in gaan op de verschillen tussen hun eigen assay en de assay van Dull *et al*, bijvoorbeeld

* Dull gebruikte een ander celtype
* Dull gebruikte een stabiele cellijn (dit betekent dat de plasmide is geïntegreerd in het genoom en dus in elke cel even hoog tot expressie komt (de cellen zijn gekweekt vanuit een kloon); dit in tegenstelling tot wat de studenten doen, namelijk transiente transfectie, waarbij het plasmide (of geen, of meerdere) door de cel is opgenomen maar daar los in ligt (geen onderdeel van het genoom). Hierdoor zal de expressie dus verschillen tussen cellen in hetzelfde kweekbakje en tussen de individuele experimenten van de studenten.
* Dull gebruikt geautomatiseerde robots voor het pipeteerwerk
* Dull gebruikt aanvullende filters (voor de fluorescentie microscoop) voor beeld-analyse om vals positieve en vals negatieve resultaten eruit te halen
* optimaliseren van assay media (celkweek medium) en tijdsduur van incubatie met liganden is in dit practicum niet echt aan de orde gekomen en kan dus nog zorgen voor een verhoging van de robuustheid.

2) Als de Z’ factor >0,5, maar lager is dan in Dull, dan kunnen de studenten nadenken over de (bovengenoemde) verschillen met Dull *et al.* en nadenken over verdere optimalisering van de assay; als de assay geschikt is kunnen de studenten in de suggestie voor vervolgonderzoek in ieder geval ingaan op de volgende stap: het ontwikkelen van een high-throughput screen (dus het op grote schaal testen van mogelijke liganden voor GR met als doel nieuwe medicijnen te vinden voor de behandeling cognitieve stoornissen = terugkoppeling maatschappelijk relevantie).

Op deze evaluatie/verklaringen kunnen ze dan aansluiten in de suggesties voor vervolg onderzoek.

**Experimentele condities**

1. Mifepristone is een antagonist maar ook een partiële agonist (afhankelijk van het weefseltype en de daarin aanwezige transcriptiefactoren). In ieder geval bindt het aan het ligand binding domein en zorgt het *wel* voor translocatie, mogelijk in tegenstelling tot de verwachting van de student. (Transcriptieregulatie is mogelijk om dat het wel in de kern terecht komt.)
Let wel: met dit practicum kunnen de studenten alleen *speculeren* over gentranscriptie d.m.v. mifepristone (literatuur => beschikbaar stellen op Blackboard), dit hebben ze niet in het practicum onderzocht! => In Dull *et al.* is dit wel getest, in de terugkoppeling naar de eerdere bevindingen kunnen de studenten dit dus benoemen en tevens beschrijven bij suggesties voor vervolgonderzoek.
2. GR vormt samen met Hsp90 een eiwitcomplex. Hsp90 is nodig voor transport van GR naar de nucleus. De antagonist Geldanamycine (17AAG) bindt aan Hsp90 (aan de ATP-binding cassette) en verhindert daarmee de translocatie naar de kern.
Als de student er zelf mee komt: Geldanamycine (17AAG) kan de afbraak van GR bevorderen door het faciliteren van ubiquitinering (signaal geven voor afbraak) van de GR. In onze data lijkt dit tweede effect niet relevant: de hoeveelheid GFP-signaal in het cytosol bij geldamycine lijkt vergelijkbaar met de hoeveelheid GFP-signaal in het cytosol bij de negatieve controle (er is dus geen afname in hoeveelheid GR eiwit, dus geen verhoogde afbraak door het proteasoom).
3. Dosis cortisol: de extra dosis die wordt onderzocht is 10 nM (100 nM cortisol is de positieve controle). Hierbij vindt translocatie naar de kern plaats, maar minder dan bij 100nM. Mogelijk is bij langere incubatietijd de translocatie naar de kern hoger. Fysiologisch zou dit kunnen betekenen dat ook niet extreem verhoogde concentraties cortisol op lange termijn vergelijkbare (transcirptionele) effecten kunnen hebben als hogere concentraties cortisol.
Verder is het effect bij de kleinere dosis is wellicht niet proportioneel met de verminderde dosis (als in: een 10x kleinere dosis levert niet een 10x kleiner signaal op).
4. Corticosteron (rat) induceert translocatie van de hGR, maar minder dan cortisol. Blijkbaar is er analogie tussen de hGR en de rat GR, omdat corticosteron ook affiniteit heeft voor de hGR. Mensen produceren ook corticosteron, maar in mindere mate dan cortisol. Ondanks dat corticosteron in de mens minder aanwezig is dan cortisol en ook minder affiniteit heeft met de hGR dan cortisol, laat dit experiment zien dat ook corticosteron de hGR kan beïnvloeden en waarschijnlijk ook gentranscriptie kan beïnvloeden. Om meer te kunnen zeggen over het verschil zouden studenten de enzymkinetiek (Vmax etc) moeten berekenen.