

Johanna Helenius ja Pauliina Mikkonen

# Virtaussytometrian testaus GLUT4-translokaation tutkimisessa ja metodissa käytettävien vasta-aineiden validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

16.11.2017

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Johanna Helenius, Pauliina Mikkonen Virtaussytometrian testaus GLUT4-translokaation tutkimisessa ja metodissa käytettävien vasta-aineiden validointi 37 sivua 16.11.2017
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Heidi Malava FM Selina Mäkinen, Helsingin yliopisto ja tutkimuslaitos Minerva Dosentti Heikki Koistinen, Helsingin yliopisto ja tutkimuslaitos Minerva
<p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata virtaussytometrian toimivuutta GLUT4-proteiinin translokaation tutkimisessa sekä validoida menetelmässä käytettyjä vasta-aineita. Työ toteutettiin yhteistyössä Lääketieteellisen tutkimuslaitos Minervan kanssa. Tavoitteena oli selvittää, voitaisiinko virtaussytometriaa menetelmänä käyttää tyypin 2 diabetekselle altistavan suomalaisspesifisen AKT2-geenivariantin tutkimisessa. AKT2-geenivariantti liittyy heikentyneeseen insuliinin signaalinsiirtoon, mikä mahdollisesti vaikuttaa GLUT4-glukoositransportterin toimintaan.</p> <p>GLUT4-glukoositransportteri on normaalitilassa solunsisäisinä rakkuloina, mutta siirtyy insuliinin vaikutuksesta nopeasti solukalvolle. Tämä insuliinin stimuloima glukoosin kuljetus lihassoluihin on keskeinen tekijä veren glukoosipitoisuuden säätelyssä. Tyypin 2 diabeteksessä insuliinin signaalireitissä esiintyy kuitenkin poikkeamia, jotka heikentävät GLUT4-transportterin siirtymistä solukalvolle ja glukoosin kuljetusta soluun.</p> <p>Koehenkilöiltä oli aikaisemman tutkimuksen yhteydessä kerätty biopsianäytteitä reiden <i>vastus lateralis</i>-lihaksesta. Näistä näytteistä oli luotu primaariset soluviljelmät, joita tässä opinnäytetyössä käytettiin virtaussytometrian testaamiseen, sekä vasta-aineiden validointiin western blotilla ja immunofluoresenssivärijäyksillä.</p> <p>Virtaussytometriaa lähdettiin testaamaan aiemman julkaisun pohjalta, mutta sitä ei saatu toimimaan odotetulla tavalla. Parhaat tulokset menetelmässä saatiin käyttämällä Santa Cruzin vasta-ainetta. Kaksi muuta testauksen kohteena ollutta vasta-ainetta eivät antaneet menetelmässä järkeviä tuloksia. Myös vasta-aineiden validoinnissa Santa Cruzin vasta-aine osoittautui toimivimmaksi. Virtaussytometrian toimivuus GLUT4-translokaation tutkimisessa jäi vielä epäselväksi ja tulevaisuudessa menetelmän optimointia tulisi jatkaa selvittämällä optimaalinen vasta-ainepitoisuus titraamalla, sekä käyttämällä täysin negatiivisia, GLUT4:ä sisältämättömiä kontrollisoluja.</p>	
Avainsanat	GLUT4, virtaussytometria, vasta-aine, validointi

Author(s) Title Number of Pages Date	Johanna Helenius, Pauliina Mikkonen Testing of flow cytometry for studying GLUT4 translocation, and validation of antibodies 37 pages 16 November 2017
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Heidi Malava, Lecturer FM Selina Mäkinen, University of Helsinki and Minerva Foundation Institute for Medical Research Docent Heikki Koistinen, University of Helsinki and Minerva Foundation Institute for Medical Research
<p>The purpose of this study was to test flow cytometry for studying GLUT4 translocation and validate antibodies used in the method. This study was carried out at Minerva Foundation Institute for Medical Research, Helsinki, Finland. The aim was to find out if flow cytometry method could be used to study AKT2 gene variant enriched in the Finnish population. AKT2 variant is associated with type 2 diabetes and impaired insulin signaling, which may affect the function of GLUT4 glucose transporter protein. GLUT4 glucose transporter plays a key role in regulating whole body glucose homeostasis.</p> <p>Muscle cell biopsies had been collected from the test subjects before the beginning of this study. Primary cell cultures were created from the samples and used in this study to test flow cytometry and to validate three different antibodies with western blot and immunofluorescence staining.</p> <p>Testing of flow cytometry was based on a previous study, however the method did not work as anticipated. The best results were obtained with Santa Cruz antibody. Other antibodies did not give sensible results in this method. Validation of the antibodies also showed Santa Cruz to be the most specific out of the tested antibodies. The functionality of flow cytometry for studying GLUT4 translocation was left questionable. In the future the optimization of the method should be continued by titrating the antibodies and using GLUT4 negative control cells.</p>	
Keywords	GLUT4, flow cytometry, antibody, validation

## Sisällys

1.	Johdanto	1
2.	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	2
3.	Diabetes	2
3.1	Insuliini	3
3.2	Insuliinin signaalinsiirto	3
4.	GLUT4-proteiini	5
5.	Virtaussytometria ja vasta-aineet	7
5.1	Virtaussytometrian menetelmäperiaate	7
5.2	Vasta-aineet	9
5.2.1	Monoklonaaliset vasta-aineet	11
5.2.2	Polyklonaaliset vasta-aineet	11
6.	Vasta-aineiden validointi	12
6.1	Validoitavat vasta-aineet	12
6.2	Immunosytokemiallinen fluoresenssivärjäys	13
6.3	Western blot	14
7.	Tutkimusprosessi	16
7.1	Virtaussytometriaprotokolla	17
7.2	Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen protokolla	18
7.3	Western blot-protokolla	20
8.	Tulokset	21
8.1	Virtaussytometriatulokset	21
8.2	Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen tulokset	27
8.3	Western blot-tulokset	29
9.	Tulosten pohdinta	31
9.1	Virtaussytometriatulosten pohdinta	31
9.2	Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen tulosten pohdinta	33
9.3	Western blot-tulosten pohdinta	34
10.	Johtopäätökset	34

11. Luotettavuus ja eettisyys	35
11.1 Luotettavuus	35
11.2 Eettisyys	36
Lähteet	38

## Termit ja lyhenteet

Transportteri = Kuljettajaproteiini

Translokaatio = Siirtyminen paikasta toiseen

Fluorokromi = Molekyyli joka absorboi valoa tietyllä aallonpituudella ja emittoi sen toisella aallonpituudella

Konjugoida = Liittää jotakin johonkin

Fosforylaatio = Fosforiryhmän siirto molekyyliltä toiselle

Tetrameeri = Neljästä samanlaisesta alayksiköstä koostuva proteiini

Isoformi = Jokin saman proteiinin eri muodoista, johtuen yhden nukleotidin vaihdoksista tai vaihtoehtoisesta silmukoinnista DNA:n kopioinnin aikana.

Deleetio = Perintöaineksen häviämä

Substraatti = Entsyymien toiminnan kohteena oleva molekyyli

Domeeni = Proteiinin toiminnallisesti tai rakenteellisesti itsenäinen osa

GTP = Guanosiinitrifosfaatti

Eksosytoosi = Aineiden kuljetus pois solusta

Endosytoosi = Aineiden kuljetus soluun

Denaturaatio = Proteiinin kvaternaari, -tertiääri tai -sekundaarirakenteen tuhoutuminen

FITC = Fluoreseiini-isotiosyanaatti

PAGE-geelielektroforeesi = Polyakryyliamidi-geelielektroforeesi

SDS = Natriumlauryylisulfaatti

SDS-PAGE = Natriumlauryylisulfaatti polyakryyliamidi-geelielektroforeesi

Konfluenssi = Solujen tiheys viljelymaljalla

Trypsinointi = Solujen irrotus viljelyalustasta trypsiinillä

Basaali = Perustilassa oleva stimuloimaton solu

PBS = Phosphate-buffered saline, fosfaattipuskuroitu saliiini

PFA = Paraformaldehydi

Myoblasti = Lihassolujen esiaste

Myotuubi = Myoblastia seuraava poikkijuovaisen lihassolun kehitysaste

NP40 = Octylphenoxypolyethoxyethanol, denaturoimaton pesuaine

BSA = Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini

DAPI = 4',6-Diamidino-2-fenyyli-indoli dihydrokloridi

PVDF = Polyvinylidifluoridi

TBST = Tris-puskuroitu saliiini ja polysorbaatti 20 (Tween20) seos

kDa = Kilodalton

## 1. Johdanto

Diabetes on joukko erilaisia sairauksia, joita yhdistää kohonneena verensokerina ilmevä aineenvaihdunnan häiriö. Maailman terveysjärjestö luokittelee diabetestyyppit tyyppin 1 ja 2 diabetekseen, raskausdiabetekseen ja muista syistä johtuvaan diabetekseen. Tyyppin 2 diabetesta sairastavia tiedetään olevan 300 000 ja sairauden ennustetaan lisääntyvän Suomessa 70 % seuraavan 10 vuoden aikana, mikäli ehkäiseviin toimiin ei ryhdytä. (Diabetesliitto a; Niskanen 2014.) Tyyppin 2 diabetes altistaa henkilön erilaisille liitännäissairauksille, mikä lisää taudin hoitokustannuksia entisestään. Tämän suuntainen kehitys on kansanterveyden kannalta huolestuttavaa ja sen kustannukset yhteiskunnalle tulevat olemaan merkittävät. (Diabetesliitto b.) Näistä syistä tyyppin 2 diabeteksen mekaniismien tutkiminen ja tutkimusta edesauttavien laboratoriomenetelmien testaaminen sekä kehittäminen on tärkeää.

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Lääketieteellisessä tutkimuslaitos Minervassa osana tutkimusryhmää, jonka mielenkiinto kohdistuu tyyppin 2 diabetekseen. Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata virtaussytometrian toimivuutta glukoositransportteri GLUT4-translokaation tutkimisessa. Virtaussytometria on laajasti käytössä oleva lasereihin perustuva menetelmä solujen tai partikkelien ominaisuuksien analysointiin (Abcam c). Menetelmällä tutkittava GLUT4-transportteri on elimistön glukoosihomeostaasin eli verensokerin tasapainon kannalta keskeinen kuljettajaproteiini, joka insuliinin stimuloimana säätelee glukoosin sisäänottoa lihassoluihin. GLUT4-proteiinin translokaatiolla viitataan sen siirtymiseen sytoplasman rakkuloista solukalvolle insuliinin stimuloimana. (Huang–Czech 2007: 237; 242.)

Keskeinen osa opinnäytetyötä oli virtaussytometriassa käytettyjen vasta-aineiden validointi immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen ja western blotin avulla. Virtaussytometrian ja eri vasta-aineiden testaamisen tavoitteena oli, että menetelmää voitaisiin mahdollisesti myöhemmin hyödyntää tyyppin 2 diabetekselle altistavan suomalaisspesifisen AKT2-P50T geenivariantin tutkimisessa. AKT2-geenivariantti liittyy alentuneeseen insuliinin signaalireitin aktivaatioon, joka mahdollisesti vaikuttaa GLUT4-transportterin translokaatioon solukalvolle (Manning ym. 2017).

## 2. Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyö toteutettiin yhteistyössä Lääketieteellisen tutkimuslaitos Minervan kanssa.

Työn tarkoituksena oli:

- testata virtaussytometrian toimivuutta GLUT4-translokaation tutkimisessa.
- validoida menetelmässä käytettyjä vasta-aineita immunosytokemiallisen fluorensenssivärjäyksen ja western blotin avulla.

Virtaussytometrian testauksen ja vasta-aineiden validoinnin tavoitteena oli:

- selvittää voitaisiinko menetelmää myöhemmin hyödyntää tyypin 2 diabetekselle altistavan suomalaisspesifisen AKT2-P50T-geenivariantin tutkimisessa.

Jotta tyypin 2 diabetesta opittaisiin hoitamaan ja ehkäisemään paremmin, on tärkeää oppia taudin syntymekanismit sekä sille altistavat geneettiset tekijät.

## 3. Diabetes

Diabetes on energia-aineenvaihdunnan häiriö, joka ilmenee veren sokeripitoisuuden kohoamisena eli hyperglykemiana. Tämä voi johtua joko insuliinin puutteesta tai heikentyneestä vasteesta kohdesolukossa. Kun insuliinia ei erity tarpeeksi, maksa tuottaa liikaa glukoosia, jota solut eivät kykene käyttämään eivätkä varastoimaan. Diabeteksen ongelmat liittyvät korkean verensokerin aiheuttamaan valkuaisaineiden rakenteiden ja toimintojen häiriintymiseen. (Saraheimo 2011: 9–10.)

Tyypin 2 diabeteksessa verensokerin kohoaminen tapahtuu hitaasti pitkällä aikavälillä ja aiheuttaa hyvin vähän oireita, minkä vuoksi taudin toteaminen tapahtuu usein sattumalta. Tyypin 2 diabeteksessa haima erittää insuliinia, mutta tyypillisesti insuliinin vaikutus on heikentynyt maksassa sekä lihas- ja rauhas kudoksessa. (Saraheimo 2011: 24–25.) Normaalisti luurankolihas poistaa glukoositransporttereiden avulla jopa 80 % verenkierrossa olevasta glukoosista insuliinin signaalireitin välittämänä. Tyypin 2 diabeteksessa insuliinin signaalireitissä esiintyy kuitenkin poikkeamia, joiden vuoksi insuliinivälitteinen GLUT4-transportterin siirtyminen solukalvolle ja glukoosin siirtyminen soluun heikentyvät (Kuvio 1, s.4). (Højlund 2014: 5;8.)

Tyypin 2 diabeteksella on vahva yhteys ihmisen perintötekijöihin ja se esiintyy yleensä suvuittain. Sairauden puhkeaminen vaatii sekä riskigeenien että taudille altistavien elintapojen yhteisvaikutusta. (Laakso 2007.) Vaikka perintötekijöiden altistava vaikutus tyy-



pin 2 diabetekseen tiedetään ja yksittäisiä altistavia geenivirheitä on löydetty useita, suurin osa perinnöllisen vaikutuksen mekanismeista on vielä selvittämättä (Højlund 2014: 2–3).

### 3.1 Insuliini

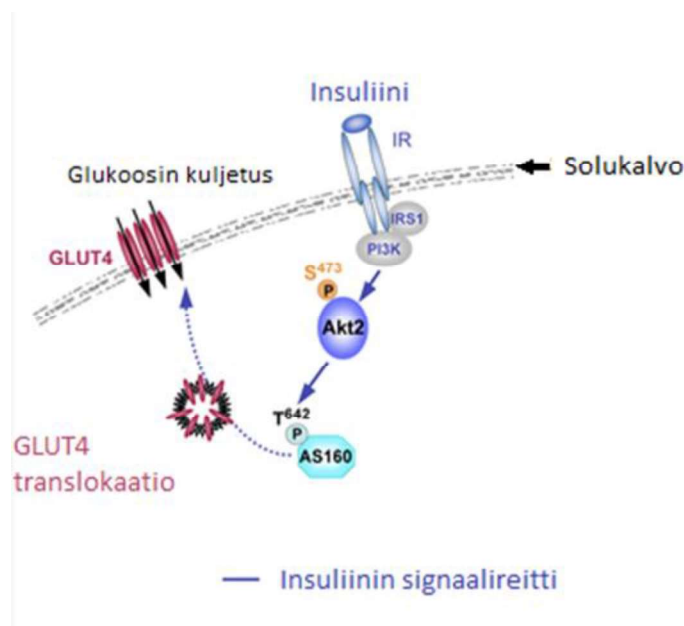
Insuliini on haiman Langerhansin saarekkeiden  $\beta$ -solujen erittämä peptidihormoni, joka yhdessä vastavaikuttajahormoni glukagonin kanssa säätelee verensokeria (Wilcox 2005: 19). Insuliinin pääasialliset kohdekudokset ovat luurankolihakset, maksa ja rasvakudos, mutta nykyisen tiedon valossa insuliinilla on tärkeitä vaikutuksia myös sydämeen, aivoihin ja endoteelin soluihin. Insuliinin pääasialliset tehtävät metaboliassa ovat glukosin sisäänoton stimulointi luurankolihaksiin ja rasvasoluihin, maksan glukoosituotannon vaimentaminen, glykogeenisynteesin edistäminen lihaksissa sekä lipolyysin estäminen rasvasoluissa. Näiden insuliinin toimintojen heikkenemisestä käytetään termiä insuliiniresistenssi. Yleisesti insuliiniresistenssillä viitataan tilaan, jossa insuliini saa aikaan poikkeavan fysiologisen vasteen kohdekudoksessaan. (Højlund 2014: 1–2.) Insuliiniresistenssi on keskeinen patogeneettinen tekijä tyypin 2 diabeteksen synnyssä ja sen vaikutukset riippuvat kudoksen tai elimen fysiologisesta toiminnasta ja siitä, tarvitsevatko ne insuliinia metabolisiin prosesseihinsa. Insuliinista riippuvaisia kudoksia ovat mm. rasva- ja lihaskudos. (Virkamäki 2011: 34; Wilcox 2005: 27.)

Tärkein insuliinierityksen säätelijä on glukoosi, joka fosforyloituu haiman beeta-soluissa glukokinaasin vaikutuksesta glukoosi-6-fosfaatiksi tuottaen adenosiinitrifosfaattia eli ATP:ta. Tämän vaikutuksesta ATP:stä riippuvaiset kaliumkanavat sulkeutuvat ja beeta-solun solukalvo depolarisoituu. Depolarisaatio johtaa solukalvon kalsiumkanavien avautumiseen ja solunsisäisen kalsiumpitoisuuden kasvuun, mikä saa aikaa insuliinin erittymisen beeta-soluista. Vaikka glukoosi onkin insuliinierityksen pääasiallinen stimuloija, myös mm. hermostolliset ärsykkeet, suolistohormonit sekä aminohapot säätelevät sen eritystä. (Wilcox 2005: 21–22.)

### 3.2 Insuliinin signaalinsiirto

Insuliinin vaikutukset välittyvät reseptorivälitteisesti. Insuliinireseptorit sijaitsevat solukalvolla ja ne ovat rakenteeltaan tetrameereja. Reseptori koostuu kahdesta solunulkoisesta

$\alpha$ -alaysyköstä ja kahdesta solunsisäisestä  $\beta$ -alaysyköstä. Kuviossa 1 on kuvattu insuliinin signaalireitti. Signaalireitissä insuliinireseptori (IR) aktivoituu insuliinin läsnä ollessa ja fosforyloi insuliinireseptorin substraattiproteiinin (IRS) tyrosiinin. Signaalireitin seuraavassa osassa IRS aktivoi fosfatidyyli-inositoli-3-kinaasin (PI3K), joka katalysoi fosfatidyyli-inositoli-4,5-bifosfaatin (PIP2) muutoksen fosfatidyyli-inositoli-3,4,5-bifosfaatiksi (PIP3). PIP3 aktivoi puolestaan proteiinikinaasi B:n eli AKT:n kahden välimuotoisen proteiinikinaasin kautta. (Huang–Czech 2007: 239.) IR/IRS, PI3-kinaasi ja AKT ovat kolme insuliinin signaalireitin "kriittistä solmukohtaa", jotka ovat keskeisiä insuliinin toiminnalle. Insuliiniresistenteissä tiloissa on havaittu häiriöitä näissä tärkeissä solmukohtissa. (Taniguchi–Emanuelli–Kahn 2006: 86.)



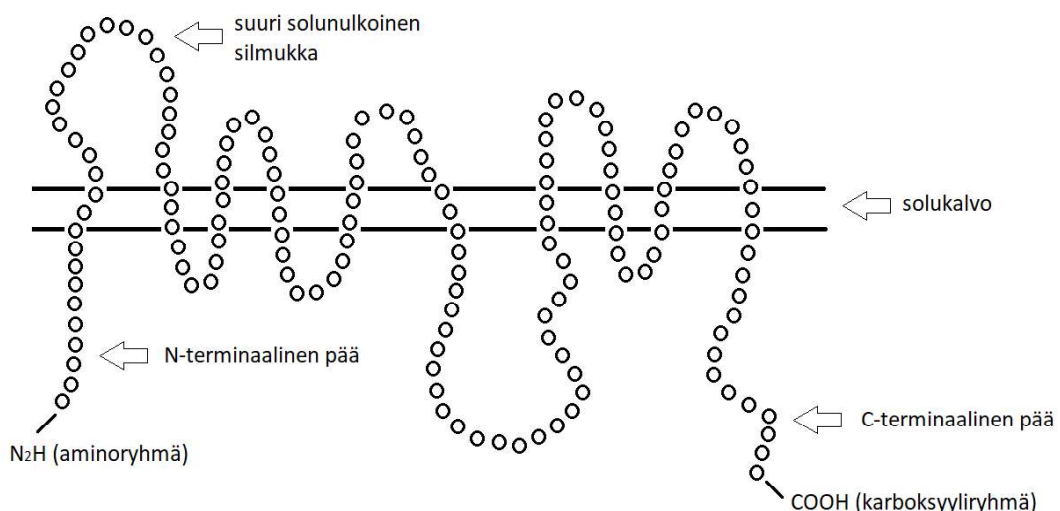
Kuvio 1. Insuliinin signaalireitti. Insuliinireseptorin aktivoituminen saa aikaan monivaiheisen ketjureaktion, jonka lopputuloksena GLUT4 siirtyy solukalvolle ja mahdollistaa glukoosin pääsyn soluun. (Kuvälähde: Wikimedia Commons. Muokattu.)

Yksi AKT:n tärkeimmistä tehtävistä on stimuloida glukoosin sisäänottoa insuliinin vaikutuksesta ja sen AKT2 isoformin on todettu olevan yhteydessä lihas- ja rasvasolujen GLUT4- glukoositransportteriin (Manning–Cantley 2007: 9). AKT:lla on yhteensä kolme eri isoformia, jotka liittyvät erilaisten biologisten prosessien säätelyyn ja ovat siten jakautuneet elimistön kudoksiin eri tavoin. AKT2:ta esiintyy erityisesti insuliiniherkissä kudoksissa ja lihassoluissa se on pääasiallinen GLUT4:n liikennettä säätelevä isoformi. (Huang–Czech 2007: 239.)

AKT:lla on useita substraatteja, joita fosforyloimalla se joko aktivoi tai inhiboi niitä. Säätelemällä näitä substraatteja AKT vaikuttaa useisiin solutapahtumiin. AS160 on tärkeä AKT:n substraatti, joka liittyy glukoosin kuljetukseen solun sisälle. AKT säätelee glukoosin sisäänottoa fosforyloimalla AS160 substraatin. Tämä fosforylaatio estää AS160:n Rab-GTPaasia aktivoivan domeenin. Rab on solunsisäistä vesikkeliliikennettä ja -fuusiota säätelevä proteiini, joka on aktiivinen GTP:tä sisältävässä muodossaan. Kun GTP:tä GDP:ksi hajottava GTP:aasi aktiivisuus estyy AKT:n fosforyloidessa AS160:n, GLUT4 glukoositransportteri siirtyy solukalvolle aktivoitua Rab GTPaasin. (Taniguchi ym. 2006: 92–93.)

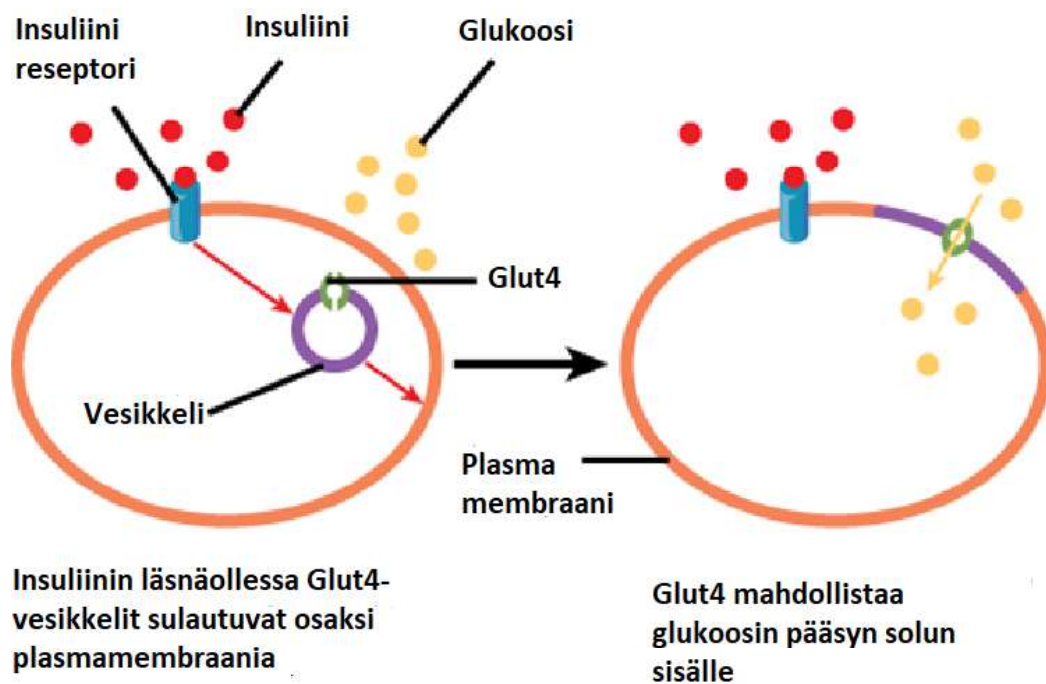
#### 4. GLUT4-proteiini

GLUT-proteiinit ovat SLC2-geenien koodaamia kuljettajaproteiineja (ns. transportteita), joita esiintyy ihmisessä 14 eri tyyppiä. GLUT-proteiinit eroavat toisistaan kinetiikan eli reaktionopeuden ja substraattispesifisyyden perusteella. Kaikki GLUT proteiinit koostuvat noin 500 aminohaposta, niillä on 12 solukalvon ylittävää domeenia ja proteiinien N- ja C-terminaaliset osat sijaitsevat sytoplasmassa. (Mueckler–Thorens 2013: 1-2; Huang–Czech 2007: 237.) N-terminaali on proteiinin tai polypeptidin alkupää, jonka loppupäässä on vapaa aminoryhmä. C-terminaali taas on proteiinin loppupää, joka päättyy vapaaseen karboksyyliinryhmään. (Reusch 2013.) Kuviossa 2 on esitetty GLUT4-proteiinin rakenne solukalvolla.



Kuvio 2. GLUT4 proteiinin rakenne. Proteiinin N- ja C-terminaalinen pää sijaitsevat sytoplasmassa. N-terminaaliosassa on vapaa aminoryhmä ja C-terminaaliosassa vapaa karboksyyliinryhmä. (Helenius–Mikkonen 2017.)

Glukoosia kuljettavia GLUT-transporttereita on vähintään viittä eri alatyyppeä, jotka esiintyvät eri kudoksissa. Nämä GLUT-transportterit erotellaan toisistaan glukoosin kuljetuskyvyn ja insuliinintarpeen perusteella. Rasva- ja lihassoluissa pääasiallinen glukositransportteri on GLUT4, joka vaatii insuliinia toimiakseen. (Wilcox 2005: 24–26.) GLUT4 käy solunsisäisissä kalvorakenteissa läpi jatkuvaa kierrätystä. Stimuloimattomassa tilassa GLUT4 on solunsisäisinä rakkuloina, mutta insuliinin tai muun stimulantin vaikutuksesta se siirtyy nopeasti sytoplasmasta solukalvolle (Kuvio 3). Insuliini stimuloi tätä GLUT4:n eksosytoosireittiä ja inhiboi endosytoosia solukalvolta. Koska insuliinin stimuloima glukoosin kuljetus lihassoluihin on keskeinen tekijä veren glukoosipitoisuuden säätelyssä, GLUT4:llä on tärkeä rooli elimistön glukoosihomeostaasin ylläpidossa. (Huang–Czech 2007: 237–239.)



Kuvio 3. GLUT4-translokaatio insuliinin stimuloimana. Insuliini kiinnittyy solukalvolla olevaan reseptoriin, jolloin GLUT4 siirtyy sytoplasmasta solukalvolle ja mahdollistaa glukoosin pääsyn soluun. (Kuvälähde: Wikimedia Commons. Muokattu)

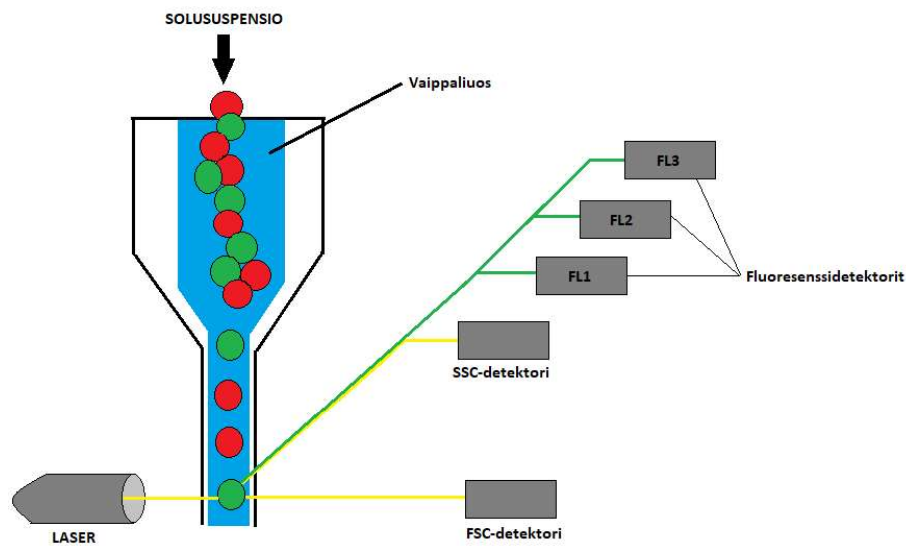
## 5. Virtausytometria ja vasta-aineet

Virtausytometrialla on mahdollista analysoida solun kokoa sekä solun sisäisiä ja ulkoisia molekyylejä ja erottaa eri solutyyppejä heterogeenisestä solupopulaatiosta. Menetelmää käytetään usein mittaamaan solun proteiineihin sitoutuneiden leimattujen vasta-aineiden tuottaman fluoresenssin intensiteettiä. (Abcam c.) Virtausytometrian toimivuutta GLUT4-translokaation tutkimisessa lähdettiin testaamaan Koshyn, Alizadehin, Timchenkon ja Beetonin vuonna 2010 julkaisemaa protokollaa mukaillen. Protokollassa GLUT4-translokaatio sytoplasmasta solukalvolle havainnoidaan immunosytokemian menetelmin hyödyntämällä fluoresenssileimattuja GLUT4 spesifisiä vasta-aineita. GLUT4-transporterin epitooppia kohtaan suunnattu primaarinen anti-GLUT4-vasta-aine ja fluoresoivalla merkkiaineella (AlexaFluor488) leimattu sekundaarinen vasta-aine inkuboidaan keskenään huoneenlämmössä, jolloin sekundaari vasta-aine sitoutuu primaariseen muodostaen vasta-ainekompleksin. (Koshy–Alizadeh–Timchenko–Beeton 2010.)

Soluissa GLUT4-translokaatio saadaan aikaan insuliinistimulaatiolla. Terveiltä eristetyissä myoblasteissa insuliinistimulaatio saa aikaan annosriippuvaisen GLUT4-translokaation solukalvolle, jolloin vasta-ainekompleksi pääsee kiinnittymään epitooppiinsa. Insuliiniresistenttien henkilöiden myoblasteissa GLUT4-translokaatiota ei tapahdu tai se on heikompi. GLUT4:ä ekspressoidaan solukalvolla vain ohimenevästi, jonka jälkeen se otetaan takaisin soluun endosytoosilla. Sitoutuneet vasta-aineet pysyvät kiinnittyneinä GLUT4:än myös endosytoosin aikana, jolloin fluoresenssisignaali ilmaisee solukalvolla olleen GLUT4:n määrän. (Koshy ym. 2010.)

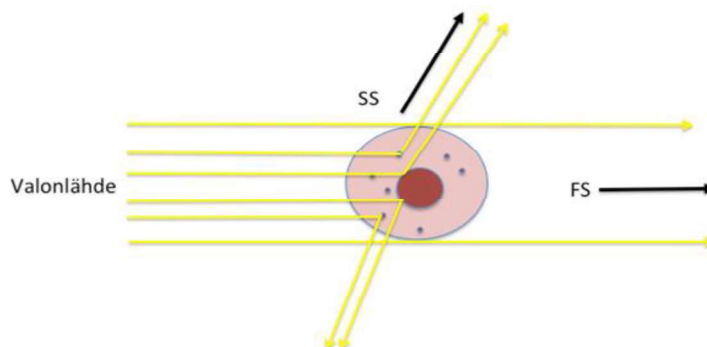
### 5.1 Virtausytometrian menetelmäperiaate

Virtausytometria on lasersäteisiin perustuva menetelmä, jota käytetään solujen määrän ja ominaisuuksien analysointiin. Kuviossa 4 on esitetty virtausytometrin toimintaperiaatetta. Virtausytometrissä soluja ympäröi vaippaliuos ja ne pakotetaan hydrodynaamisen fokusoinnin avulla kapean suuttimen läpi. Pieni nestevirta kuljettaa solut yksitellen lasersäteen ohi, jolloin laserin osuessa soluun tapahtuu valon sirontaa. Tämä sironta mitataan erilaisilla detektoreilla eli ilmaisimilla. Suoraan säteen edessä oleva detektorit mittaa solusta eteenpäin sironnutta valoa FS (forward scatter) ja sivuilla olevat detektorit sivulle sironnutta valoa SS (side scatter). Mahdolliselle fluoresenssisignaalille on myös oma detektorinsa. (Abcam c.)



Kuvio 4. Virtausytometrian periaate. Vaippaliuksessa olevat solut pakotetaan hydrodynaamisen fokuoinnin avulla kapean suuttimen läpi, jossa solut kulkevat yksitellen lasersäteen ohi. Valon sironta ja fluoresenssi mitataan detektoreilla. (Helenius–Mikkonen 2017.)

Eteenpäin sironnut valo antaa tietoa solun koosta, suurempien partikkelien taittaessa enemmän valoa kuin pienempien. Sivuille sironnut valo puolestaan kertoo solun sisäisestä rakenteesta, esimerkiksi granulaarisuudesta (Kuvio 5). FC- ja SS-kanavan tiedot yhdistämällä saadaan karkeasti eroteltua eri solupopulaatioita toisistaan. Tämä kuitenkin riippuu aina näytetyypistä ja tavallisesti yksityiskohtaisemman erottelun tekemiseksi tarvitaan fluoresenssileimoja. (Bio Rad b: 4.)



Kuvio 5. Valon sironta. Valonlähteen osuessa soluun tapahtuu sirontaa, joka voidaan mitata detektoreilla. Solusta eteenpäin sironnutta valoa kuvaa FS ja sivulle sironnutta valoa SS. (Helenius–Mikkonen 2017.)

Fluoresenssileimojen avulla pystytään tunnistamaan ja tutkimaan suoraan haluttua epitoppeja. Tämä tapahtuu konjugoimalla fluorokromi epitopille spesifiseen vasta-aineeseen. Fluorokromit absorboivat valoenergiaa annetulla aallonpituudella ja emittoivat sen pidempinä, näkyvän valon aallonpituuksina. Tätä prosessia kutsutaan eksitaatioksi ja emissioksi. Emissio seuraa eksitaatiota hyvin nopeasti synnyttäen fluoresenssisignaalia. (Bio Rad b: 11–13.)

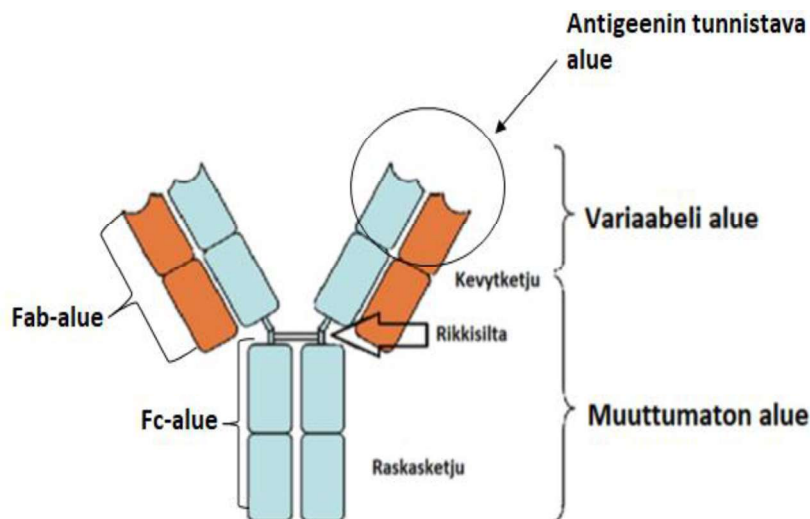
Fluoresenssisignaalien mittaaminen eri aallonpituuksilla voi antaa kvantitatiivisia tai kvalitatiivisia tuloksia solun pinnalla olevista reseptoreista tai solunsisäisistä molekyyleistä. Suurin osa virtaussytometreista käyttää eri kanavia ja detektoreita mittaamaan emittoitunutta valoa. Mittauksen spesifisyyttä kontrolloidaan optisten filttereiden avulla, joiden tehtävänä on päästää vain tietyt aallonpituudet lävitseen ja estää muut. (Bio Rad b: 4.)

Kun solu tulee laserin kohdalle, siitä syntyvä siroava valo sekä fluoresenssisignaali synnyttävät virran elektroneita detektorin anodille. Tämän elektronivirran suuruus on verrannollinen solusta sironneen valon tai sen fluoresenssin intensiteettiin. Kun solun reuna saapuu laserin kohdalla, elektronien määrä alkaa nousta saavuttaen huippunsa solun ollessa laserin keskellä, jolloin solu on kokonaan valaistuna. Solun jatkaessa matkaansa laserin lävitse, elektronien määrä laskee ja solun ohittaessa laserin elektronien määrä on tippunut takaisin lähtötasoon. Tätä syntyvää elektronipulssia kutsutaan tapahtumaksi (event). Nämä tapahtumat näkyvät saaduissa tuloksissa. Tapahtumien alaraja tulisi määrittää siten, että siihen yltyvät vain halutut solut. Jos alarajaa ei aseteta, virtaussytometri analysoi kaikki näytteessä olevat partikkelit aiheuttaen suuren määrän taustasignaalia, jonka alle halutut tapahtumat saattavat jäädä. (Bio Rad b: 6–7.)

## 5.2 Vasta-aineet

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig) ovat aktivoituneiden B-lymfosyyttien eli plasmakloneiden erittämiä glykoproteiineja. Vasta-aineet sijaitsevat plasmassa ja solunulkoisissa nesteissä, jossa ne toimivat osana elimistön immuunijärjestelmää ja vastaavat immuunipuolustuksen ensireaktiosta elimistön kohdatessa antigeenin. (Lipman–Jackson–Trudel–Weis–Garcia 2005: 258.) Antigeenillä tarkoitetaan mitä tahansa vierasta ainetta, joka saa aikaan immuunivasteen joutuessaan kudoksiin (Chemicon International 2004: 2). Vasta-aineilla on kyky tunnistaa ja kiinnittyä tunnistamiinsa antigeeneihin suurella herkkyydellä ja spesifisyydellä. Näiden ominaisuuksiensa ansiosta niitä käytetään yleisesti myös tutkimus-, diagnostiikka- ja hoitotarkoituksissa. (Lipman ym. 2005: 258.)

Kuviossa 6 on esitetty vasta-aineen perusrakenne. Vasta-aineet esiintyvät yhtenä tai useampana Y-kirjaimen muotoisena Ig-yksikkönä, jotka koostuvat neljästä polypeptidiketjusta; kahdesta identtisestä raskasketjusta ja kahdesta identtisestä kevytaketjusta. Nämä ketjut pysyvät yhdessä muun muassa disulfidi-sidoksilla. (Lipman ym. 2005: 259.) Jokainen Ig-yksikkö koostuu kahdesta erillisestä alueesta: yksikön kärkiosissa on kaksi kevyt- ja raskasketjuista koostuvaa Fab-aluetta ja molekyylin häntäosassa pelkästä raskasketjusta koostuva Fc-alue. Fab-alue koostuu kahdesta variaabelista domeenista ja kahdesta vakiodomeenista. Fab alueen variaabelit domeenit muodostavat vasta-aineen variaabelin alueen, jonka tehtävänä on antigeenin tunnistus. Fab-alueen vakiodomeenit ja Fc-alue muodostavat puolestaan vasta-aineen muuttumattoman alueen. (Genscript: 4.)



Kuvio 6. Vasta-aineen perusrakenne. Kuvassa on esitetty raskasketjut vaaleansinisellä ja kevytketjut oranssilla. Merkittynä ovat myös rikkisilta, Fc-alue, Fab-alue ja vasta-aineen antigeenin tunnistava alue. (Kuvälähde: Wikimedia Commons. Muokattu)

Vasta-aineet jaetaan yksiköiden määrän ja raskasketjun tyypin perusteella viiteen luokkaan: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Ig-luokka määrää minkälaisen vasteen kyseinen vasta-aine saa aikaan sekä kuinka pitkään antigeenille altistumisesta kestää, ennen kuin vaste tapahtuu. (Lipman ym. 2005: 258; Chemicon International 2004: 3.) Vasta-aineet tunnistavat epitoopiksi kutsutun pienen osan antigeenistä. Epitooppi koostuu yleensä 5–8 aminohappotähteestä tai 1–6 monosakkaridista antigeenin pinnalla. Vasta-aineen affiniteetillä tarkoitetaan sen antigeeniä sitovan kohdan sitoutumisvoimakkuutta epitooppiin. Vasta-aineen aviditeetillä puolestaan tarkoitetaan koko antigeenin ja sitä vastaan tuotun vasta-aineen välistä sidosvoimaa. Affiniteetti ja aviditeetti vaikuttavat vasta-aineen



spesifisyyteen, eli sen kykyyn sitoutua täsmällisesti antigeenin tiettyyn epitooppiin. Korkean spesifisyyden omaavilla vasta-aineilla ristireagoinnin mahdollisuus laskee. Ristireagoinnilla tarkoitetaan vasta-aineen sitoutumista toisen antigeenin epitooppiin. Tämä saattaa johtua vasta-aineen matalasta aviditeetista, spesifisyydestä tai eri antigeenien epitooppien samankaltaisuudesta. (Chemicon International 2004: 2–4.)

### 5.2.1 Monoklonaaliset vasta-aineet

Monoklonaaliset vasta-aineet ovat keinotekoisesti muodostetun hybridoomasolun tuottamia. Vasta-aineita tuottava hybridooma saadaan aikaan fuusioimalla aktivoitunut vasta-aineita tuottava B-lymfosyytti ja myeloomasolu. Hybridooman tuottamat vasta-aineet ovat keskenään identtisiä ja ne reagoivat spesifisesti antigeenin yhteen tiettyyn epitooppiin. (Genscript: 1–2; Chemicon International 2004: 5.)

Monoklonaaliset vasta-aineet toimivat hyvin analyysien primaari vasta-aineina ja ne värjäävät taustaa vähemmän kuin polyklonaaliset vasta-aineet. Monoklonaalisten vasta-aineiden homogeenisuuden ansiosta niillä saadaan aikaan myös hyvä toistettavuus, kun koeolosuhteet pidetään muuttumattomina. (Chemicon International 2004: 5.) Monoklonaalisten vasta-aineiden korkean spesifisyyden vuoksi pienetkin muutokset antigeenin epitoopissa voivat tehdä vasta-aineen toimintakyvyttömäksi. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotantoprosessi on myös aikaa vievä ja kallis. (Pacific Immunology.)

### 5.2.2 Polyklonaaliset vasta-aineet

Polyklonaaliset vasta-aineet ovat monoklonaalisisista vasta-aineista poiketen eri B-solulinjojen tuottamia, joten ne reagoivat saman antigeenin eri epitooppeja vastaan. Koska polyklonaaliset vasta-aineet tunnistavat useita epitooppeja, ne sietävät paremmin muutoksia antigeenin rakenteessa. Tämän vuoksi polyklonaalisia vasta-aineita käytetään usein denaturoitujen proteiinien tunnistamisessa. (Chemicon International 2004: 5.) Polyklonaaliset vasta-aineet ovat herkkiä ja niillä on korkea affiniteetti antigeeniä vastaan, mutta niiden spesifisyys on huonompi kuin monoklonaalisilla vasta-aineilla ja tämän vuoksi myös ristireaktioita syntyy enemmän (Pacific Immunology).

## 6. Vasta-aineiden validointi

Vasta-aineiden validointiin käytettiin sytokemiallista immunofluoresenssivärjäystä ja western blotia. FDA:n (US Food and Drug Administration) oppaassa Bioanalytical Method Validation validointi määritellään prosessiksi, jossa spesifisen laboratoriotyön perusteella osoitetaan analyttisen menetelmän soveltuvuus sen aiottuun käyttötarkoitukseen. Vasta-aineiden validoinnissa osoitetaan, että ne ovat spesifisiä, selektiivisiä ja niillä saadut tulokset voidaan toistaa. (FDA 2001: 2.) Validoinnilla pyrittiin siis osoittamaan, että vasta-aineet tunnistavat spesifisesti kohdeproteiininsa GLUT4:n soluista. Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen avulla haluttiin myös tutkia, onko insuliinistimuloitujen ja ei-stimuloitujen basaalisolujen välillä eroa GLUT4:n määrässä solukalvolla.

### 6.1 Validoitavat vasta-aineet

Tässä opinnäytetyössä validoinnin kohteena oli kolme anti-GLUT4 vasta-ainetta eri valmistajilta. Taulukossa 1. on kerrottu tämän työn kannalta olennaiset tiedot vasta-aineista. Tiedot ovat peräisin valmistajien tuoteselosteista.

Taulukko 1. Validoinnin kohteena olevat vasta-aineet.

Vasta-aine	Santa Cruz	Abcam	Aviva Systems Biology (FITC)
<b>Klonaalisuus</b>	Monoklonaalinen	Polyklonaalinen	Polyklonaalinen
<b>Terminaalisuus</b>	N-terminaalinen	C-terminaalinen	N-terminaalinen
<b>Missä eläimessä tuotettu</b>	Hiiri	Kani	Kani
<b>Western blotissa havaittavan bandin koko membraanilla</b>	n. 50 kDa	n. 45 kDa	n.55 kDa

Vasta-aineen terminaalisuudella tarkoitetaan sitä, sitoutuuko se tutkittavan proteiinin N-terminaaliseen vai C-terminaaliseen päähän. Ainoastaan Aviva Systems Biologyn FITC-vasta-aineesta tiedetään sen tarkka sitoutumiskohta, joka sijaitsee GLUT4-proteiinin N-terminaaliossa päässä olevassa suuressa solukalvon ulkoisessa silmukassa (Aviva Systems Biology). Santa Cruzin vasta-aineen sitoutumispaikka voisi mahdollisesti olla tässä samassa silmukassa, sillä myös se on N-terminaalinen vasta-aine (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Abcamin vasta-aine on C-terminaalinen ja se sitoutuu oletettavasti

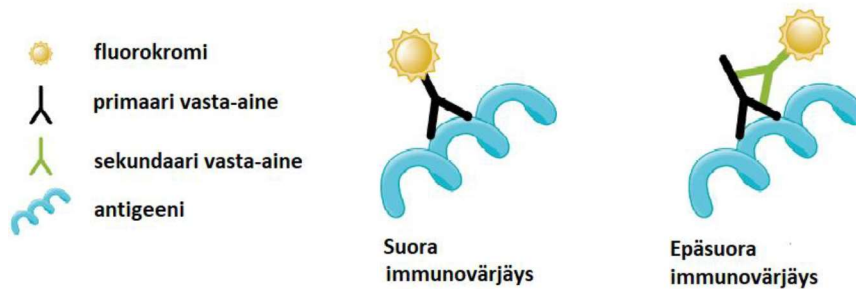
GLUT4-proteiinin solukalvon alaiseen "häntään" (Abcam a). Vasta-aineen C-terminaalisuus huomioitiin lisäämällä virtaussytometria- ja immunovärjäysprotokoliin permeabilisointivaihe. Permeabilisoinnissa detergentti tekee solukalvoon reikiä, jolloin vasta-aineet pääsevät sitoutumaan myös solunsisäisiin kohteisiin (Maity–Sheff–Fisher 2013).

Aviva Systems Biologyn vasta-aine on jo itsessään leimattu fluoresoivalla FITC-merkkiaineella, jolloin sekundaari vasta-ainetta ei periaatteessa tarvita. Vasta-aineen antama fluoresenssisignaali oli kuitenkin niin heikko, että sekundaari vasta-ainetta päädyttiin joka tapauksessa käyttämään kaikissa protokollissa.

## 6.2 Immunosytokemiallinen fluoresenssivärjäys

Immunovärjäyksellä tarkoitetaan kohdeproteiinin havainnointia yksittäisistä soluista (immunosytokemia) tai kudoksesta (immunohistokemia) spesifisten leimattujen vasta-aineiden avulla. Värjäyksillä on mahdollista tutkia proteiinien ekspressiota eli ilmentymistä sekä sijaintia ja jakautumista näytemateriaalissa. Immunovärjäysten peruseriaate on samankaltainen: vasta-aine sitoutuu kohdeantigeeniin näytteessä ja tulos detektoidaan esimerkiksi kemiluminesenssin tai immunofluoresenssin avulla. Kemiluminesenssia hyödyntävissä menetelmissä vasta-aine on leimattu entsyymillä, tavallisesti HRP:llä (Horse-radish peroxidase). Immunofluoresenssia hyödyntävissä menetelmissä vasta-aine on leimattu jollain fluorokromilla. (Maity ym.2013; Chemicon International 2004.)

Immunofluoresenssivärjäykset voidaan tehdä joko suoralla tai epäsuoralla menetelmällä (Kuvio 7). Suorassa immunovärjäyksessä käytetään vain yhtä fluorokromilla leimattua primaari vasta-ainetta, joka on suunnattu kiinnostuksen kohteena olevaa antigeenia kohtaan. Epäsuorassa immunovärjäyksessä käytetään kahta eri vasta-ainetta. Primaari vasta-aine on leimaamaton ja se sitoutuu normaalisti kohdeantigeeniin. Fluorokromilla leimattu sekundaari vasta-aine on suunnattu primaari vasta-ainetta kohtaan ja sitä käytetään tuloksen detektointiin. (Abcam b.) Sekundaari vasta-ainetta käytettäessä on huomioitava, että se luotu primaari vasta-aineen lähteen immunoglobuliineja vastaan. Esimerkiksi jos primaari vasta-aine on kasvatettu hiiressä, sekundaari vasta-aineen tulee olla jossain toisessa eläimessä kasvatettu anti-hiiri vasta-aine. (Chemicon International 2004: 21.)



Kuvio 7. Suoran ja epäsuoran immunovärjäyksen erot. Suorassa värjäyksessä primaari vasta-aine on suoraan konjugoitu fluorokromilla, kun taas epäsuorassa värjäyksessä käytetään fluorokromilla konjugoitua sekundaari vasta-ainetta. (Kuvälähde: Wikimedia Commons. Muokattu)

Suoran immunovärjäyksen etuja ovat nopeus, helppous ja ristireagoinnin minimointi. Toisaalta leimatut primaari vasta-aineet ovat kalliita ja fluoresenssisignaali on tavallisesti heikompi. Epäsuoran immunovärjäyksen etuja ovat herkkyys ja halvempi hinta. Menetelmän haittapuolina voidaan pitää ristireaktioita ja näytteen endogeenisistä vasta-aineista aiheutuvaa taustan värjäytymistä. (Abcam b.) Tässä opinnäytetyössä käytettiin epäsuoraa menetelmää kaikkien peitinlasien värjäyksessä.

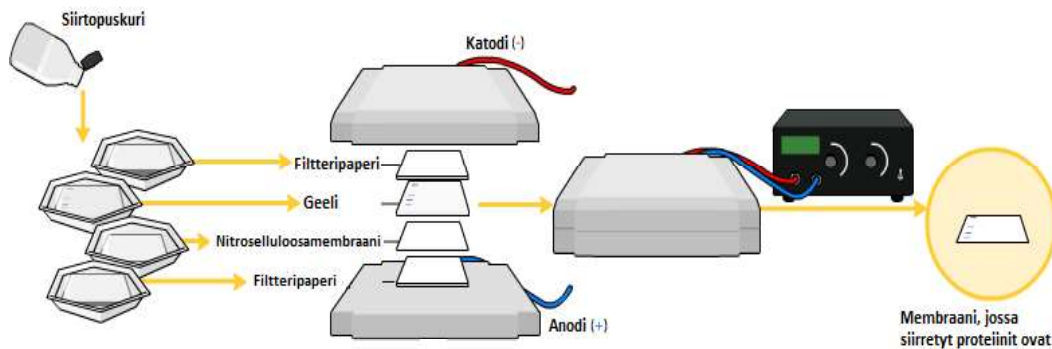
### 6.3 Western blot

Western blot-menetelmän avulla voidaan tunnistaa toisistaan eroteltuja proteiineja käyttämällä niihin spesifisesti kiinnittyviä vasta-aineita (Abcam d: 10). Menetelmässä proteiinit erotellaan PAGE- eli polyakryyliamidi-geelielektroforeesilla kokonsa perusteella ja siirretään membraanille, josta ne voidaan tunnistaa ja detektoida vasta-aineiden avulla. Yleensä PAGE-geelielektroforeesi suoritetaan denaturoivissa olosuhteissa lisäämällä ajettaviin näytteisiin natriumlauryylisulfaattia (SDS). Tällöin geelijaosta käytetään termiä SDS-PAGE. (Chemicon International 2004: 10.)

Western blotissa käytettävien näytteiden solut tulee ensin lysata eli hajottaa. Näin solujen proteiinit pääsevät liikkumaan geelin läpi toisistaan erillään ja ne pystytään myöhemmin tunnistamaan. Lysispuuskurin valinta ja näytteiden käsittely riippuvat aina käytettävästä vasta-aineesta ja sen kyvystä tunnistaa denaturoitu proteiinirakenne. Western blot-analyysia suunniteltaessa onkin huomioitava, että osa vasta-aineista tunnistaa proteiinin vain sen kolmiulotteisessa natiivimuodossa. (Abcam d: 1–2.)

Käytettävän vasta-aineen epitooppi saattaa sijaita proteiinin kolmiulotteisen rakenteen sisällä, jolloin proteiini tulee avata eli denaturoida vasta-aineen sitoutumisen mahdollistamiseksi. Proteiinin denaturoiminen tapahtuu kuumentamalla näytteitä SDS:ää sisältävässä Laemmli-latauspuskurissa. Denaturaatioissa solulysoattien proteiinit kiinnittyvät latauspuskurin SDS-anioneihin, jotka kiertyvät niiden "tukirankana" toimivan polypeptidiketjun ympärille ja häiritsevät proteiinien ei-kovalenttisia sidoksia. SDS varaa proteiinit negatiivisesti suhteessa proteiinien massaan, joten proteiinien kulkeutuminen geelillä ei perustu polypeptidiketjujen luontaiseen varaukseen vaan niiden molekyylipainoon. (Abcam d: 5.)

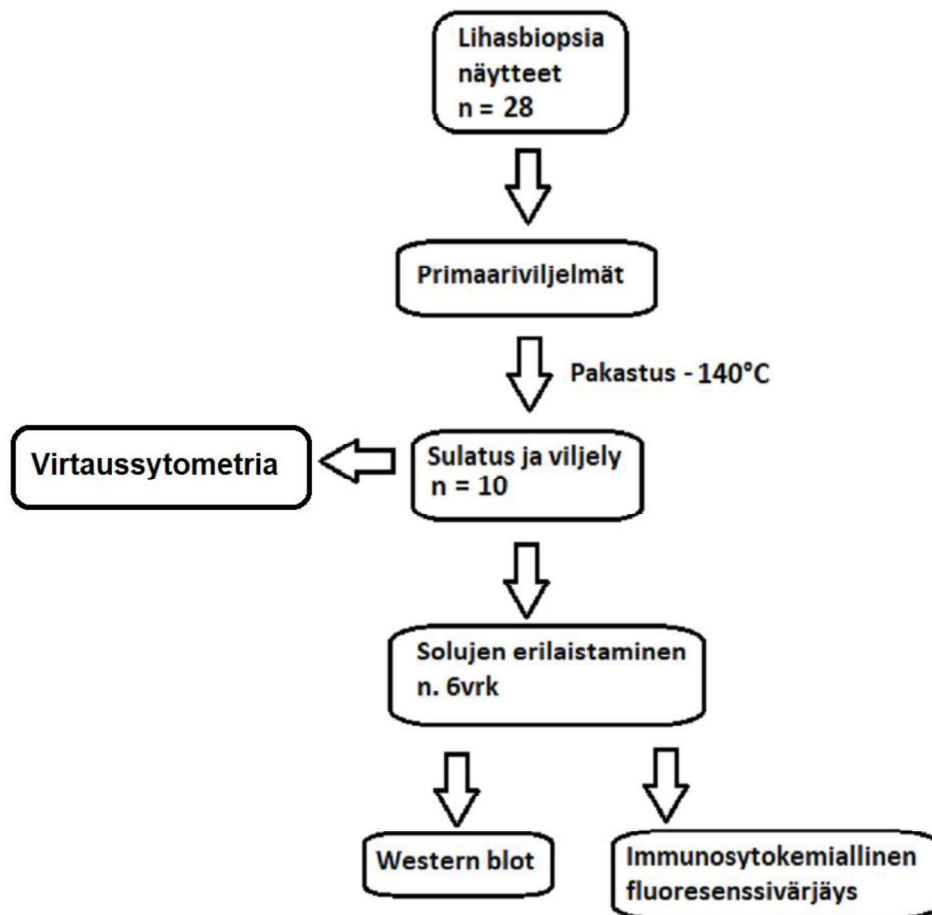
Denaturoidut proteiinit siirretään PAGE-geelille, jossa ne ajautuvat sähkövirran vaikutuksesta kohti positiivista napaa. SDS-PAGE geelijonon jälkeen proteiinit siirretään geeliltä nitroselluloosa- tai PVDF-membraanille esimerkiksi elektroblottaus menetelmällä. Menetelmässä geelistä, membraanista ja suodatinpaperista muodostetaan "sandwich", joka asetetaan kahden samansuuntaisen elektrodin väliin. Kun systeemiin johdetaan virtaa, proteiinit siirtyvät elektroforeesilla geeliltä membraanille (Kuvio 8). Haluttu proteiini pysytään tunnistamaan membraaninilta inkuboimalla sitä spesifisessä vasta-aineessa. Tuloksen detektointia varten joko primaari- tai sekundaari vasta-aineen tulee olla leimattu esimerkiksi entsyymillä ja tuloksen detektointitapa riippuu tästä vasta-aineen leimasta. (Chemicon International 2004: 12.) Detektointi voi perustua kolorimetrisen reaktion, kemiluminesenssin tai fluoresenssiin (Bio Rad a).



Kuvio 8. Elektroblottaus. Filteripaperit, membraani ja geeli kastellaan siirtopuskurissa, jonka jälkeen niistä kootaan anodin ja katodin väliin laitettava "sandwich". Systeemiin johdetaan virtaa, jolloin proteiinit siirtyvät geeliltä membraanille. (Kuvälähde: Wikipedia. Muokattu)

## 7. Tutkimusprosessi

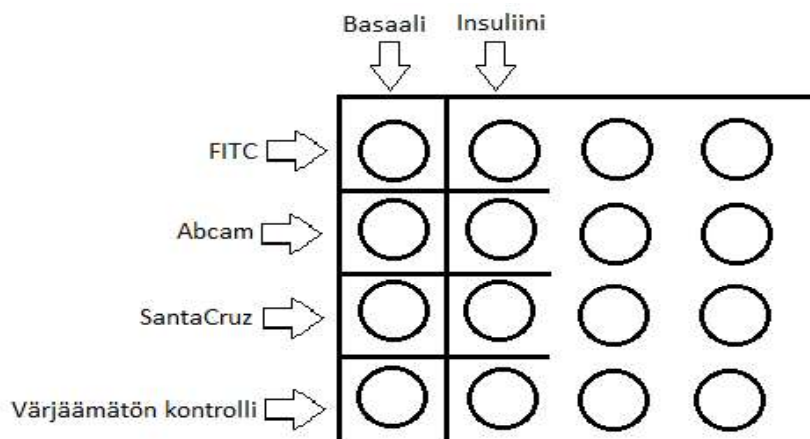
Aiempiin tutkimuksiin valituilta koehenkilöiltä on kerätty reiden *vastus lateralis*-lihaksesta biopsianäytteitä. Näistä on luotu ennen tämän projektin aloitusta primaariset soluviljelmät, jotka on pakastettu  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen. Tätä opinnäytetyötä varten soluja sulatettiin uusinaviljelyä varten. Soluviljelmiä käytettiin virtaussytometriamittauksiin, immunosytokemiallisiin peitinlasivärjyksiin sekä western blot-ajoihin (Kuvio 9). Tarkoituksena oli testata virtaussytometrian toimivuutta GLUT4-translokaation tutkimisessa sekä validoida menetelmässä käytettäviä vasta-aineita. Virtaussytometriaa testattiin myoblastien lisäksi rotan L6-solulinjalla.



Kuvio 9. Prosessikaavio opinnäytetyön kulusta.

## 7.1 Virtaussytometriaprotokolla

Solut viljeltiin pulloissa 60–80% konfluentiksi, jonka jälkeen niille suoritettiin yön yli starvaatio. Starvaatiossa kasvutekijöiden saanti minimoidaan ja näin herkistetään solut tulevalle insuliinistimulaatiolle. Starvaation jälkeen solut trypsinoidiin ja siirrettiin kuoppalevylle. Alkuperäisessä Koshyn ym. virtaussytometriaprotokollassa solut siirrettiin kuoppalevylle niin, että yhteen kuoppaan tuli noin 100 000 solua. Tässä opinnäytetyössä analyysia testattiin sekä alkuperäisellä solumäärällä, että tuplaamalla solujen määrä 200 000 soluun/kuoppa. Solujen annettiin toipua trypsinoinnista 30 minuuttia +37 asteessa, jonka jälkeen suoritettiin insuliinistimulaatio ja vasta-aineiden lisäys. Kuviossa 10 on esitetty pipetointikaavio vasta-aineiden ja insuliinin lisäämisestä. Insuliinista käytettiin 200nM laimennosta niin, että sen loppukonsentraatio soluilla oli 100nM. Puolet soluista jätettiin ei-stimuloituiksi kontroleiksi (basaali) ja kahteen kuoppaan ei lisätty vasta-aineita (värjäämätön kontrolli). Vasta-aine inkubaation kesto oli 30 minuuttia +37 °C.



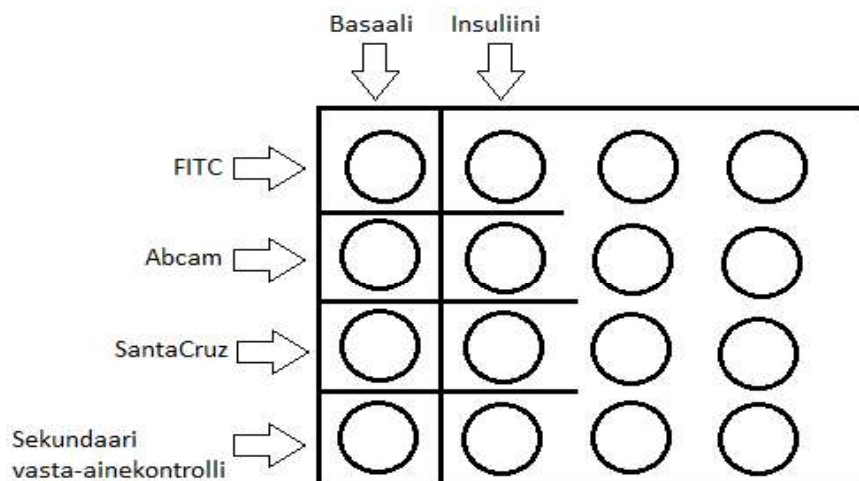
Kuvio 10. Virtaussytometriaprotokollan pipetointikaavio. Oikealla ovat insuliinistimuloituneet ja vasemmalla basaalisolut. Protokollaa testattiin kaikilla kolmella vasta-aineella, joiden lisäksi mukaan otettiin värjäämätön kontrolli. (Kuvälähde: Helenius–Mikkonen 2017.)

Vasta-aine inkubaation jälkeen solut fiksattiin eli kiinnitettiin 1 % PFA-PBS:llä 20 minuuttia. Fiksatus solut irrotettiin kuoppalevystä soluraaputtimella ja siirrettiin pipetoimalla Falcon-putkiin, joissa solut pestiin sentrifugaatiota hyödyntäen. Pesuvaiheiden jälkeen solut siirrettiin virtaussytometriaputkiin "solusiivilän" läpi solujen sakkautumisen estämiseksi. Analyysi suoritettiin BD Accurin C6 virtaussytometrillä. Keskiarvoinen fluoresenssin intensiteetti (MFI) mitattiin analysaattorin FL1-detektorilla. Mittauksen rajaksi asetettiin 10 000 solua, jonka jälkeen siirryttiin seuraavaan näytteeseen. Syntynyt data käsiteltiin ja analysoitiin käyttäen BD Accuri C6 Analysis -ohjelmaa.

## 7.2 Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen protokolla

Immunosytokemiallisessa fluoresenssivärjäyksessä solut viljeltiin steriileille peitinlaseille. Viljelmän annettiin kasvaa 70–80% konfluentiksi niin, että solut olivat levittyneet lasille tasaisesti. Kasvatuksen jälkeen solut erilaistettiin myoblasteista myotuubeiksi pitämällä niitä 6 vuorokautta differentiaatiomediassa, jossa kasvatusmedian seerumipitoisuus laskettiin 20 %:sta 2 %:iin. Seerumi sisältää runsaasti kasvutekijöitä, jotka pitävät solut proliferaatiotilassa, jolloin erilaistumista ei tapahtu. Kasvumedian seerumipitoisuuden lasku stimuloi soluja erilaistumaan kypsemiksi soluiksi ylläpitääkseen normaalia toimintaa muuttuneissa kasvuolosuhteissa. Solujen erilaistamista seurasi yön yli starvaatio, jonka avulla solut herkistettiin tulevalle insuliinistimulaatiolle. Puolet soluista jätettiin ei-stimuloituiksi kontrollisoluiksi (basaali). Insuliinistimulaation jälkeen kaikki peitinlasit fiksattiin 4 % PFA:lla 20 minuuttia huoneenlämmössä. Fiksaation tarkoituksena on estää solujen rappeutuminen ja säilyttää niiden morfologia (Maity ym. 2013).

Kuviossa 11 on esitetty värjäyksen peitinlasiasetelma. Värjäystä varten valittiin samalta henkilöltä yksi insuliinistimuloitu ja yksi basaali peitinlasi. Käytettävissä olleen vasta-ainemäärän puitteissa saman henkilön peitinlaseja ei kuitenkaan voitu värjätä kaikilla kolmella vasta-aineella.



Kuvio 11. Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen peitinlasiasetelma. Oikealla ovat insuliinistimuloituneet solut ja vasemmalla basaalisolut. Värjäyksiä tehtiin kaikilla kolmella vasta-aineella ja sekundaari vasta-aineen spesifisyys tarkastettiin kontrollilla. (Kuvälähde: Helenius–Mikkonen 2017.)



Ennen värjäysprotokollaan aloittamista, Abcamin peitinlaseille tehtiin 5 minuutin permeabilisointi 0,5 % NP40-PBS:llä, koska kyseessä on C-terminaalinen vasta-aine. Kaikille peitinlaseille tehtiin vielä 10 minuutin blokkaukset 3 % BSA-PBS:llä ennen primaari vasta-aineiden lisäystä. BSA-blokkaukset estää epäspesifistä taustan värjäytymistä (ThermoFisher Scientific). Taulukossa 2. on esitetty primaari vasta-aineiden laimennus 0,1 % BSA-PBS:ään perustuen vasta-aineiden tuoteselostuksen ohjeeseen.

Taulukko 2. Primaari vasta-aineiden laimennus 0,1 % BSA-PBS:ään.

Vasta-aine	Laimennossuhde	Inkubaatio
Rabbit anti-GLUT4-FITC (Aviva Systems Biology)	1:50	45 min, +37 °C
Mouse anti-GLUT4 (Santa Cruz)	1:50	45 min, +37 °C
Rabbit anti-GLUT4 (Abcam)	1:200	45 min, +37 °C

Primaari ja sekundaari vasta-aineen inkubaation välissä suoritettiin pesuvaihe, jossa sitoutumaton primaari vasta-aine huuhdottiin pois. AlexaFluor 488-merkkiaineella leimatun sekundaari vasta-aineen spesifisyys tarkistettiin laittamalla kahdelle peitinlasille pelkkää sekundaari vasta-ainetta. Taulukossa 3. on esitetty sekundaari vasta-aineen laimennus 0,1 % BSA-PBS:ään.

Taulukko 3. Sekundaari vasta-aineiden laimennus 0,1 % BSA-PBS:ään.

Vasta-aine	Laimennossuhde	Inkubaatio
AlexaFluor 488 anti-rabbit tai anti-mouse	1:200	60 min, huoneenlämpö

Sekundaari vasta-aineen inkubaation jälkeen sitoutumaton vasta-aine huuhdottiin jälleen pois. Värjäyksen lopuksi peitinlasit kiinnitettiin objektilasille tumavärin (DAPI) sisältävällä kiinnitysluoksella ja katsottiin Zeiss Observer Z1- fluoresenssimikroskoopin 100x öljyobjektiivilla sekä valokuvattiin.

### 7.3 Western blot-protokolla

Western blot-protokolla aloitettiin haluttujen solujen viljelyllä ja solulysaattien valmistuksella. 6-kuoppalevyille viljeltyjä myoblasteja erilaistettiin myotuubeiksi 7 vuorokauden ajan, jonka jälkeen osalle myotuubeista suoritettiin insuliinistimulaatio. Tämä tapahtui lisäämällä kuoppiin insuliinia niin, että sen loppupitoisuudeksi tuli 100nM ja inkuboimalla soluja 10 min +37 °C. Loput myotuubeista jätettiin basaalitilaan. Inkubaation jälkeen solut pestiin kylmällä PBS:llä ja kuoppiin lisättiin 0,5 % NP-40 lyysipuskuria, johon oli lisätty proteaasi-inhibiittoreita. Näytteiden lyysauksen jälkeen työskentelyä jatkettiin +4 asteessa jäällä, mikä yhdessä proteaasi-inhibiittoreiden kanssa hidastaa välittömästi lyysauksen jälkeen alkavaa proteiinien proteolyysia, defosforylaatiota ja denaturaatiota (Abcam d: 3).

Kuoppalevyiltä solut kaavittiin merkittyihin eppendorf-putkiin muovisilla soluraaputtimilla ja valmiit lysaatit pakastettiin -80 °C odottamaan jatkokäsittelyä. Lysaatit sulatettiin jäällä ja sonikoitiin neljän sekunnin ajan ultraäänellä, mikä hajottaa solurakenteet vapauttaen solujen sisältämät proteiinit lysaattiin. Sonikaation jälkeen jäljelle jääneet solurippeet sentrifugoitiin alas ja pinnalle jäänyt supernatantti otettiin talteen. Solulysaattien valmistuksen jälkeen niiden proteiinikonsentraatio määritettiin Pierce-BCA-menetelmän avulla. Saatujen proteiinikonsentraatioiden mukaan laskettiin, kuinka paljon mitäkin näytettä tulee laimentaa, jotta niiden konsentraatiot vastaavat toisiaan.

Laimennettuihin solulysaatteihin pipetoitiin nelinkertainen Laemmli-puskuri ja näytteitä kuumennettiin 20 minuuttia +56 °C. Denaturoivan SDS:än lisäksi Laemmli-puskuri koostuu disulfididoksia pelkistävästä 2-merkaptotaanolinista sekä bromifenolinsinistä ja glyserolista, jotka helpottavat näytteiden pipetointia geelille (Abcam d 5). Näytteet sekä molekyylipainomarkkeri ajettiin 10 % SDS-PAGE-geelille. Markkereita käytettiin apuna geelillä ilmenevien proteiinien koon määrittelyssä sekä elektroforeesin etenemisen seuraamisessa (Abcam d: 7).

Geelijaon jälkeen proteiinit siirrettiin geeleiltä PVDF-membraaneille elektroblottauksen avulla. Proteiinien siirron onnistuminen tarkistettiin BIO RAD:in ChemiDoc Touch- kuvantamislaitteella. Membraanit huuhdeltiin TBST:llä ja niistä leikattiin talteen alueet, joissa haluttu proteiini on. Leikatut membraanisuikeleet blokattiin 5 % maito-TBST:llä vasta-aineiden epäspesifisen taustaan kiinnittymisen välttämiseksi (Abcam d: 11).

Blokkauksen jälkeen membraaneja inkuboitiin primaarivasta-aineessa ravistajalla +4 asteessa yön yli. Kylmässä inkubointi estää kontaminaatioita ja ravistajalle jättäminen edistää vasta-aineiden tasaista sitoutumista (Abcam d 12). Seuraavana päivänä membraanit pestiin huolellisesti TBST:llä ylimääräisen primaarivasta-aineen poistamiseksi, jonka jälkeen suoritettiin sekundaarivasta-aine inkubaatio. Sekundaari vasta-aineena käytettiin HRP:llä leimattua anti-rabbit tai -mouse vasta-ainetta. Sekundaari vasta-aineen inkubaation ja pesujen jälkeen membraaneille tehtiin ECL-detektio (enhanced chemiluminescence). ECL-detektiossa membraanit kehitettiin BIO-RAD:in ChemiDoc Touch-laitteella, jonka kamera tunnistaa membraanin lähettämän kemiluminesenssin ja muuntaa sen digitaaliseksi valokuvaksi (Abcam d: 12).

## **8. Tulokset**

### 8.1 Virtausytometriatulokset

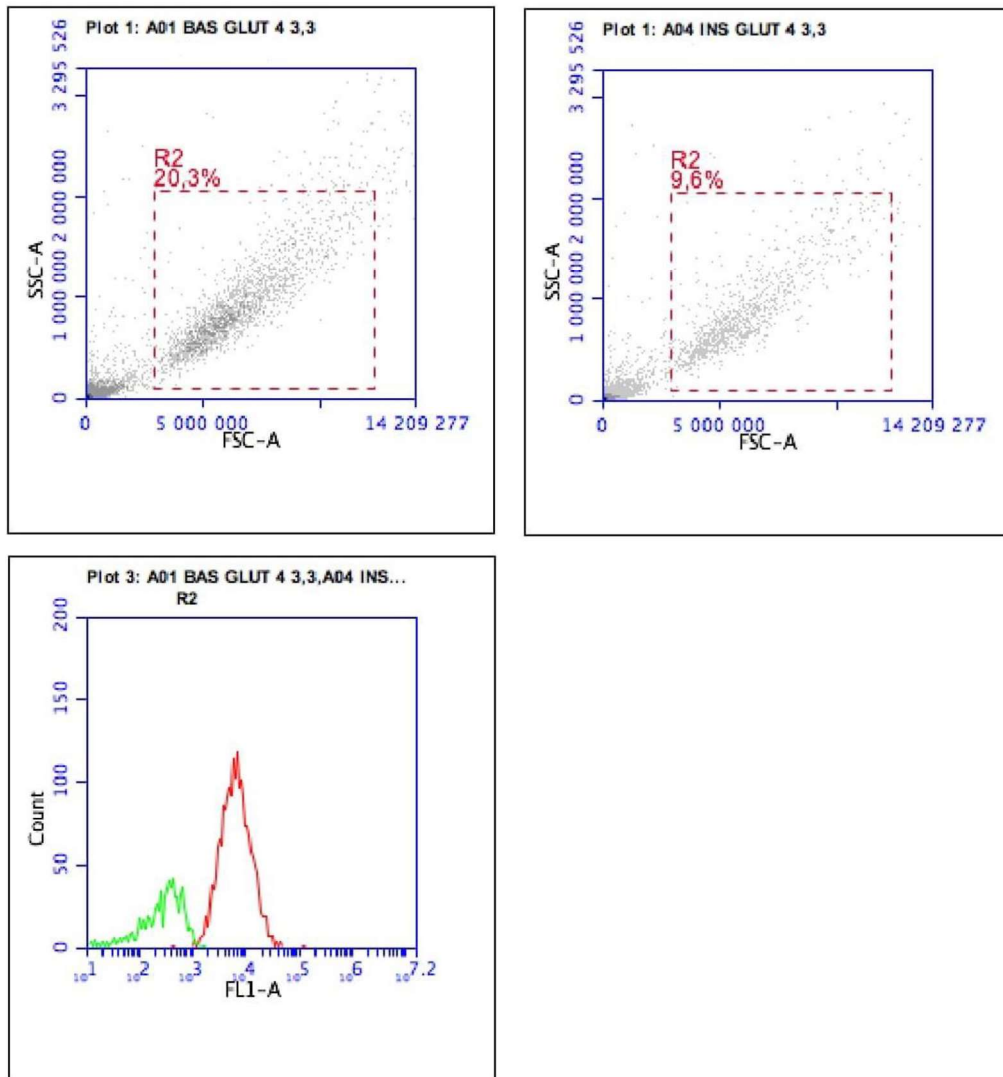
Virtausytometriasta saatu data käsiteltiin BD Accuri C6 Analysis-ohjelman avulla helpommin analysoitavaan muotoon (Taulukko 4). Saatu data normalisoitiin kunkin basaali-insuliini -näyteparin basaaliarvoon, jolloin se sai arvon 1. Normalisoinnin avulla insuliinistimuloituille soluille saatiin lukuarvo, joka kertoo, kuinka moninkertainen niistä saatu intensiteetti on verrattuna saman henkilön basaalisolujen intensiteettiin. Näin eri vasta-aineiden vertailu keskenään on mahdollista. Taulukossa 4. on esitetty solujen keskiarvoinen GLUT4 fluoresenssi-intensiteetti (MFI) sekä counts-arvo, joka kertoo elävien solujen osuuden 10 000 lasketusta solusta. Lisäksi taulukossa on mainittu "countsien" prosenttiosuus kaikista tapahtumista. Taulukon tulokset on avattu kuvioissa 12, 13, 14 ja 15.

Taulukko 4. Solujen antama keskiarvoinen fluoresenssi-intensiteetti (MFI), elävien solujen määrä (counts) ja niiden prosenttiosuus kaikista tapahtumista eri vasta-aineilla. Insuliini-stimuloitujen arvot on normalisoitu ei-stimuloituihin kontrollinäytteeseen (basaali).

		<b>Basaali</b>	<b>Insuliini</b>
<b>Abcam</b>			
<b>MFI</b>	Myoblastit	1,000	921,996
<b>Counts</b>		757	333
<b>%-osuus kaikista tapahtumista</b>		7,57 %	3,33 %
<b>FITC</b>			
<b>MFI</b>	Myoblastit	1,000	0,003
<b>Counts</b>		2 028	964
<b>%-osuus kaikista tapahtumista</b>		20,28 %	9,64 %
<b>Santa Cruz</b>			
<b>MFI</b>	Myoblastit	1,000	2,245
<b>Counts</b>		261	805
<b>%-osuus kaikista tapahtumista</b>		2,61 %	8,05 %
	<b>L6-solulinja</b>		
<b>MFI</b>		1,000	1,615
<b>Counts</b>		2 310	953
<b>%-osuus kaikista tapahtumista</b>		23,10 %	14,02 %

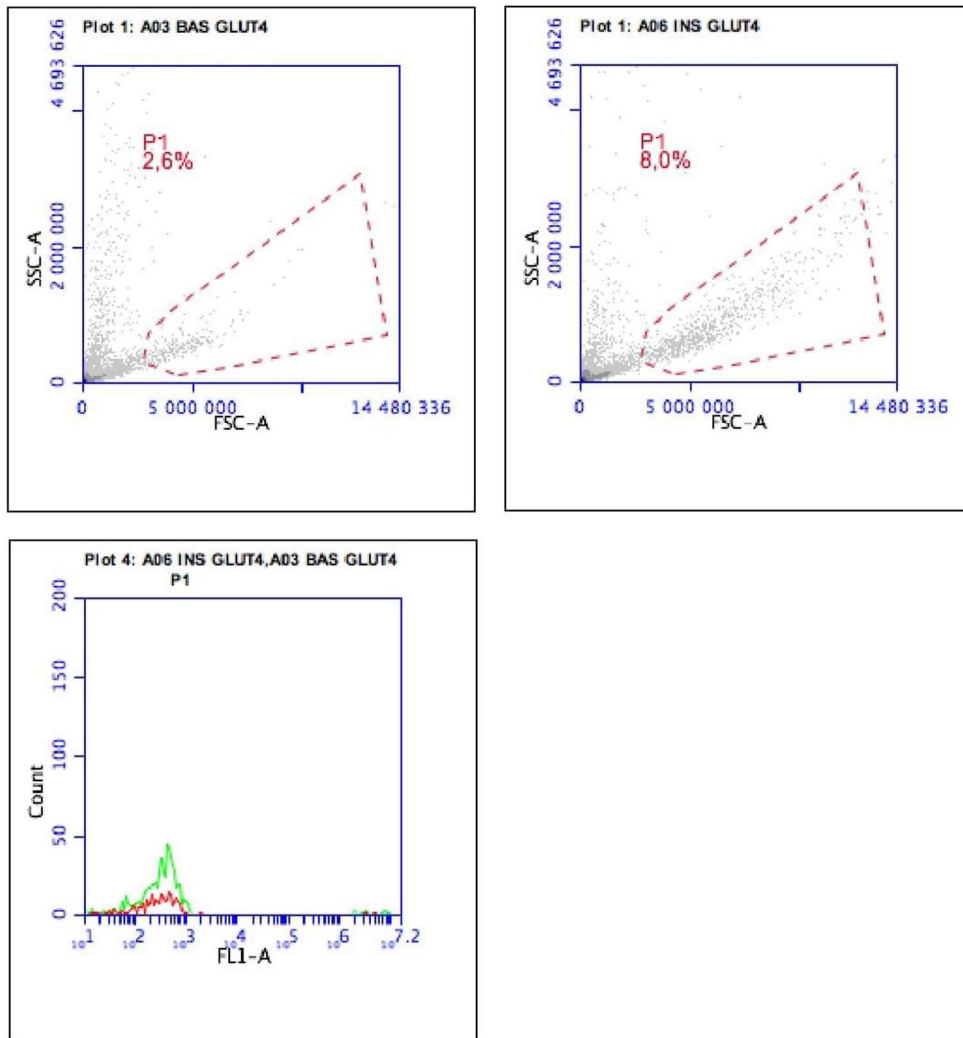
Kuvioissa 12, 13, 14 ja 15 on kuvattu ylärivillä solupopulaatioiden rajaukset (gating) sirontakuvioiden y-akselilla on sivulle sironneen valon määrä (SSC-A) ja x-akselilla eteenpäin sironneen valon määrä (FSC-A). Näiden sirontakuvioiden alapuolella on kuvattu basaali- ja insuliinistimuloitujen solujen fluoresenssin intensiteetin vertailukäyrät. Vertailukäyrässä y-akselilla on counts-arvo ja x-akselilla FL1-A filterin mittaama fluoresenssin intensiteetti. Basaalisolujen fluoresenssin intensiteetti on kuvattu punaisella käyrällä ja insuliinistimuloitujen vihreällä käyrällä.

Kuviossa 12 on kuvattu tarkemmin FITC vasta-aineella saadut tulokset myoblasteilla. Ylhäällä vasemmalla on basaalisolujen rajausta, jossa elävien solujen osuus on 20,3 % 10 000 lasketusta solusta. Ylhäällä oikealla näkyy vastaava rajausta insuliinistimuloituista soluista, jossa elävien solujen osuus lasketuista soluista on vain 9,6 %. Fluoresenssin vertailukäyrästä nähdään, että insuliinistimuloitujen solujen intensiteetti on huomattavasti basaalisolujen intensiteettiä matalampi.



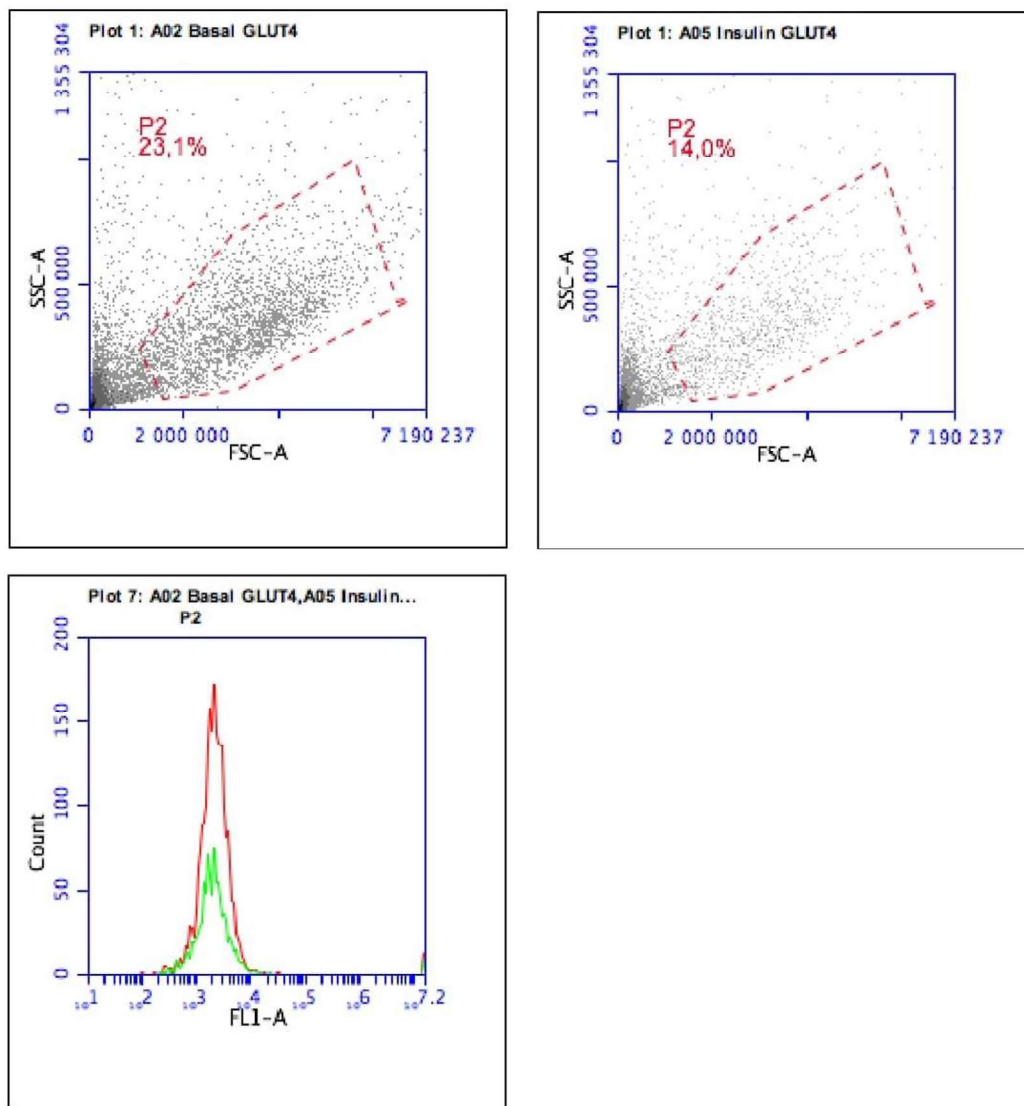
Kuvio 12. FITC vasta-aineen tulokset myoblasteilla. Solupopulaatioiden rajaukset (gating) ylärivillä ja fluoresenssin vertailukäyrä alhaalla vasemmalla. Vasemmalla ylhäällä on basaalisolujen populaation rajausta (R2) ja oikealla insuliinistimuloitujen solujen populaation rajausta (R2). Fluoresenssin vertailukäyrässä basaalisolujen intensiteetti on esitetty punaisella ja insuliinistimuloitujen vihreällä.

Kuviossa 13 on esitetty tarkemmin Santa Cruz vasta-aineella saadut tulokset myoblasteilla. Ylhäällä vasemmalla on basaalisolujen rajausta, jossa elävien solujen osuus on vain 2,6 % 10 000 lasketusta solusta. Ylhäällä oikealla näkyy vastaava rajausta insuliinistimuloitujen soluista, jossa elävien solujen osuus lasketuista soluista on 8 %. Fluoresenssin vertailukäyrästä nähdään, että insuliinistimuloitujen solujen ja basaalisolujen intensiteetit ovat lähes samalla tasolla. Insuliinistimuloitujen solujen intensiteetti on vain hieman basaalisolujen intensiteettiä korkeampi.



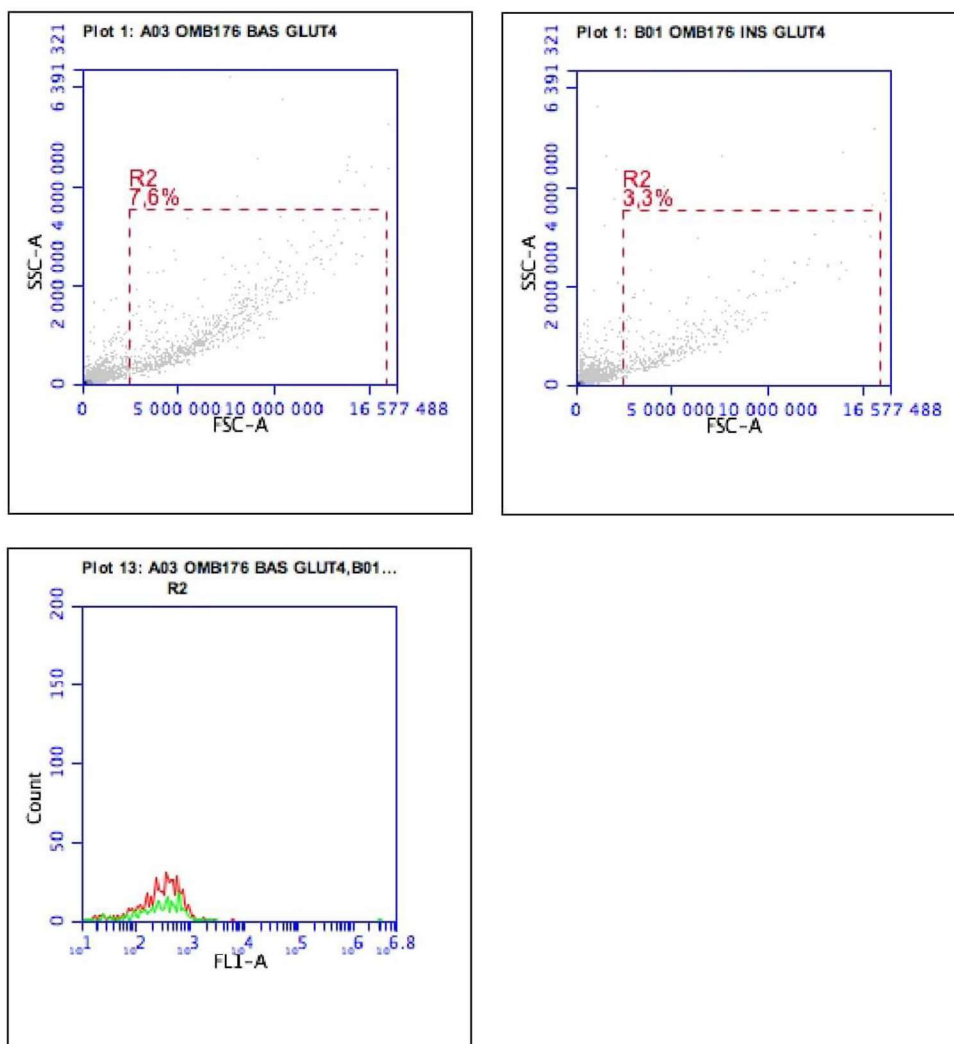
Kuvio 13. Santa Cruz vasta-aineen tulokset myoblasteilla. Solupopulaatioiden rajaukset (gating) ylärivillä ja fluoresenssin vertailukäyrä alhaalla vasemmalla. Vasemmalla ylhäällä on basaalisolujen populaation rajausta (P1) ja oikealla insuliinistimuloitujen solujen populaation rajausta (P1). Fluoresenssin vertailukäyrässä basaalisolujen intensiteetti on esitetty punaisella ja insuliinistimuloitujen vihreällä.

Kuviossa 14 on esitetty tarkemmin Santa Cruz vasta-aineella saadut tulokset rotan L6-solinjan soluilla. Ylhäällä vasemmalla on basaalisolujen rajaus, jossa elävien solujen osuus on 23,1 % 10 000 lasketusta solusta. Ylhäällä oikealla näkyy vastaava rajaus insuliinistimuloitujen soluista, jossa elävien solujen osuus lasketuista soluista on 14 %. Fluoresenssin vertailukäyrästä nähdään, että insuliinistimuloitujen solujen ja basaalisolujen intensiteetit ovat lähes samalla tasolla. Insuliinistimuloitujen solujen intensiteetti on vain hieman basaalisolujen intensiteettiä korkeampi.



Kuvio 14. Santa Cruz vasta-aineen tulokset L6-solinjan soluilla. Solupopulaatioiden rajaukset (gating) ylävirvillä ja fluoresenssin vertailukäyrä alhaalla vasemmalla. Vasemmalla ylhäällä on basaalisolujen populaation rajaus (P2) ja oikealla insuliinistimuloitujen solujen populaation rajaus (P2). Fluoresenssin vertailukäyrässä basaalisolujen intensiteetti on esitetty punaisella ja insuliinistimuloitujen vihreällä.

Kuviossa 15 on esitetty tarkemmin Abcamin vasta-aineella saadut tulokset myoblasteilla. Ylhäällä vasemmalla on basaalisolujen rajaus, jossa elävien solujen osuus on 7,6 % 10 000 lasketusta solusta. Ylhäällä oikealla näkyy vastaava rajaus insuliinistimuloituista soluista, jossa elävien solujen osuus lasketuista soluista on vain 3,3 %. Fluoresenssin vertailukäyrästä nähdään, että insuliinistimuloitujen solujen ja basaalisolujen intensiteetit näyttävät olevan samalla tasolla. Kuitenkin Taulukon 4. datan mukaan insuliinistimuloitujen solujen intensiteetti oli 921,996-kertainen basaalisolujen intensiteettiin verrattuna. Tämä saattaa johtua väärästä positiivisesta signaalista, joka näkyy pienenä vihreänä piikkinä käyrän oikeassa reunassa.



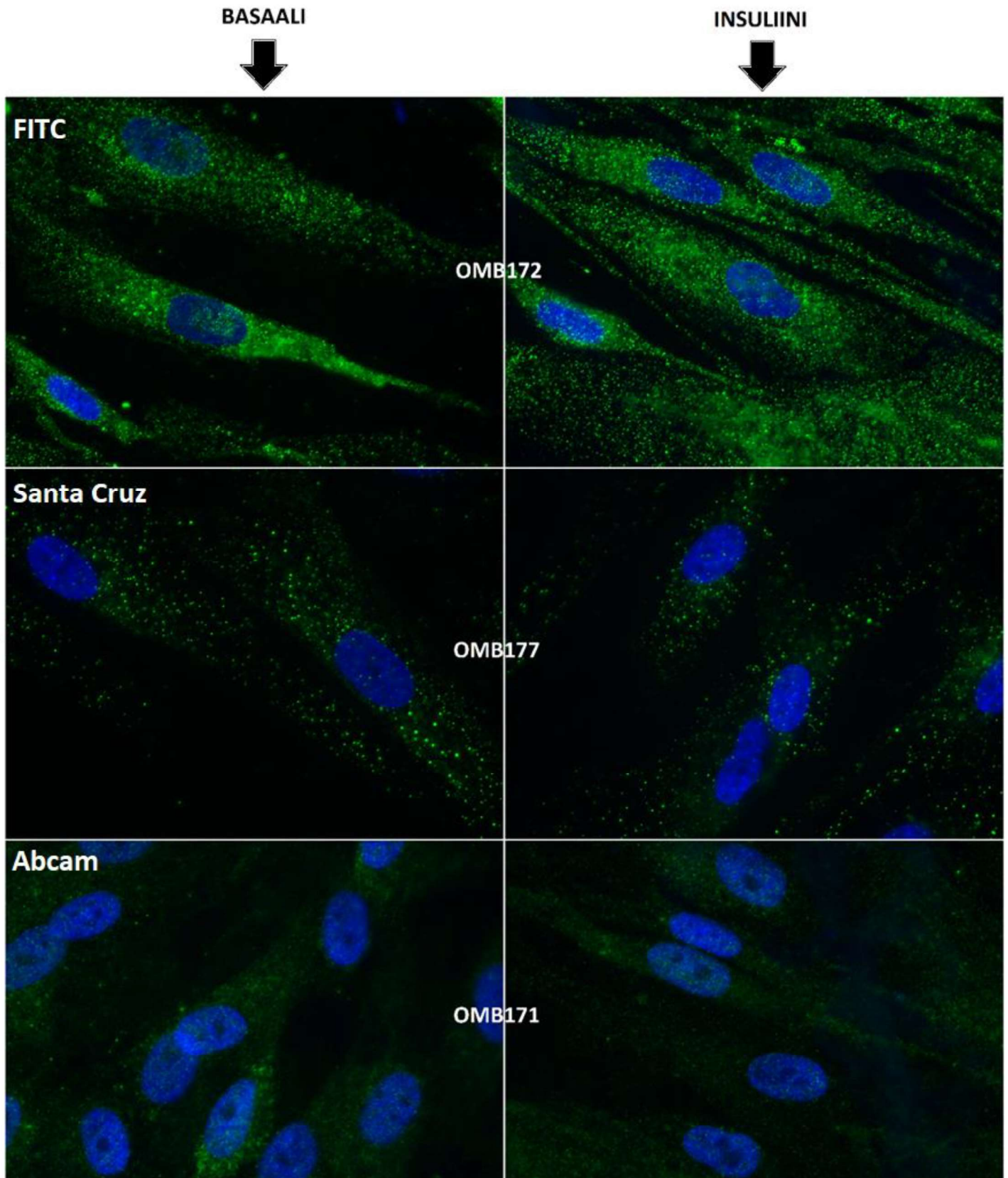
Kuvio 15. Abcam vasta-aineen tulokset myoblasteilla. Solupopulaatioiden rajaukset (gating) ylärivillä ja fluoresenssin vertailukäyrä alhaalla vasemmalla. Vasemmalla ylhäällä on basaalisolujen populaation rajaus (R2) ja oikealla insuliinistimuloitujen solujen populaation rajaus (R2). Fluoresenssin vertailukäyrässä basaalisolujen intensiteetti on esitetty punaisella ja insuliinistimuloitujen vihreällä.



## 8.2 Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen tulokset

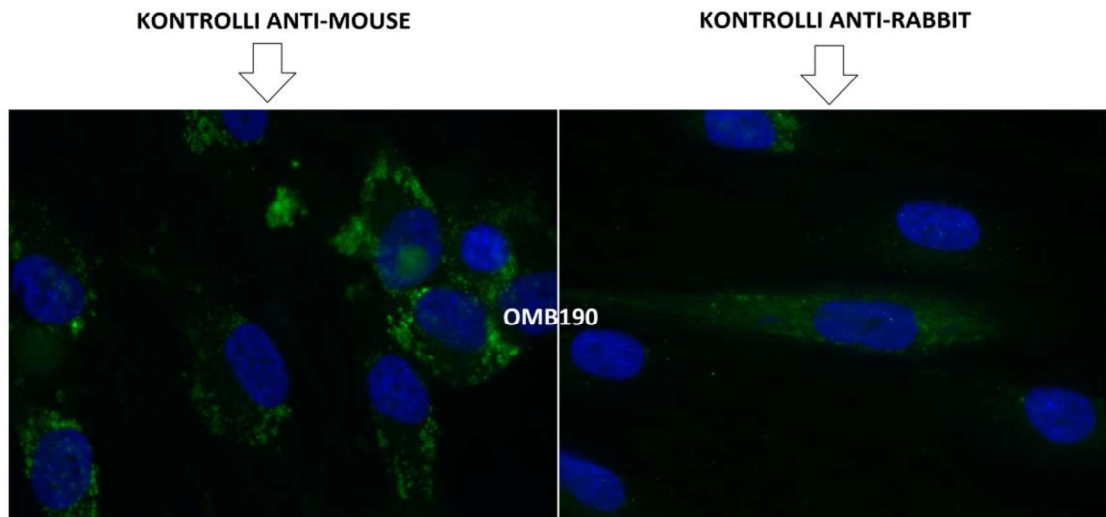
Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen tulokset on esitetty seuraavalla sivulla Kuviossa 16, jossa on kaikilla kolmella vasta-aineella tehdyt värjäykset allekkain. Pystysarakkeessa vasemmalla ovat basaalisolut ja oikealla insuliinistimuloidut solut. Kuvissa näkyvät OMB-numerot ovat lihasbiopsian antaneiden henkilöiden näytetunnuksia.

GLUT4-proteiini on värjäytynyt vihreiksi pisteiksi, ja kiinnitysliuoksen DAPI on värjännyt tumat siniseksi. Kuvissa näkyy hyvin fluoresenssisignaalin voimakkuuden vaihtelu ja värjäysjäljen ero eri vasta-aineiden välillä. Esimerkiksi FITC vasta-aine antaa Santa Cruzin ja Abcamin vasta-aineeseen verrattuna voimakkaamman signaalin. Abcamin vasta-aine on muista käytetyistä vasta-aineista poiketen C-terminaalinen, eli se värjää myös solunsisäisen GLUT4:n. Tämä näkyy voimakkaampana värjäytymisenä erityisesti solun tumman ympärillä.



Kuvio 16. Immunocytokeemiallinen fluoresenssivärjäys kaikilla kolmella vasta-aineella eri henkilöiden soluista. GLUT4 on värjäytynyt vihreäksi ja DAPI on värjännyt solujen tumat siniseksi. Pystysarakeessa on vasemmalla basalisolut ja oikealla insuliinistimuloit. (Kualähde: Helenius–Mikkonen 2017.)

Vasta-aineiden spesifisyyttä testattiin kontrollisoluilla, jotka värjättiin pelkällä sekundaari vasta-aineella (Kuvio 17). Tämän tarkoituksena oli osoittaa sekundaari vasta-aineesta peräisin oleva taustasignaali. Primaari vasta-ainevärjykseen verrattuna pelkkä sekundaari vasta-aine antaa heikompaa ja erityyppistä signaalia.



Kuvio 17. Sekundaari vasta-ainekontrollit. Solut on värjätty pelkällä sekundaari vasta-aineella, joka näkyy heikkona vihreänä signaalina. Oikealla anti-mouse kontrolli ja vasemmalla anti-rabbit kontrolli. DAPI on värjännyt tumat siniseksi. (Kuvälähde: Helenius–Mikkonen 2017.)

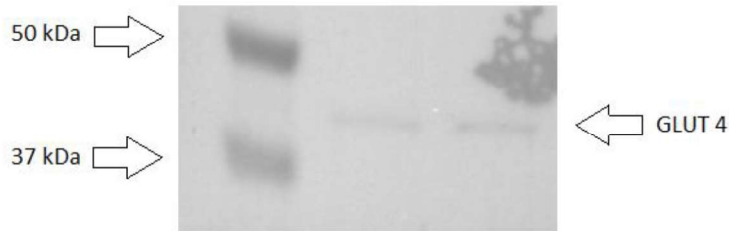
### 8.3 Western blot-tulokset

FITC vasta-aineen western blot-tuloksista näkyy, että vasta-aine on tunnistanut kohdeproteiininsa GLUT4:n, joka näkyy membraanilla noin 55 kDa kokoisena bandina. GLUT4-bandin yläpuolella näkyy myös ylimääräinen tumma bandi, jonka merkitystä ei tiedetä (Kuvio 18).



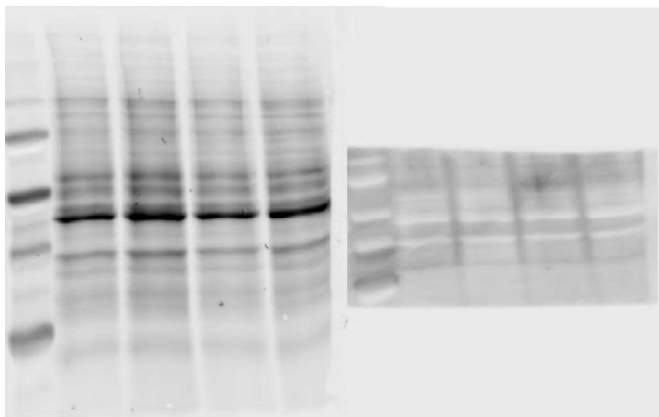
Kuvio 18. FITC western blot-tulokset. GLUT4 näkyy noin 55 kDa kokoisena vaaleampana bandina membraanilla. Molekyylipainomarkkerit ovat vasemmalla. (Helenius–Mikkonen 2017.)

Santa Cruzin vasta-aineen western blot-tuloksista näkyy, että vasta-aine on tunnistanut kohdeproteiininsa GLUT4:n, joka näkyy membraanilla hyvin haaleana n. 45 kDa kokoisena bandina (Kuvio 19).



Kuvio 19. Santa Cruz western blot-tulokset. GLUT4 näkyy hyvin haaleana noin 45 kDa kokoisena bandina membraanilla. Molekyylipainomarkkerit ovat vasemmalla. (Kuvälähde: Helenius–Mikkonen 2017.)

Abcamin vasta-aineen western blot-tulokset on esitetty Kuviossa 20. Kun värjäämätöntä geeliä ja vasta-aineella inkuboitua membraania tarkasteltiin lähemmin, huomattiin että niissä näkyy täysin samat bandit. Tämän vuoksi ei voida sanoa varmasti, mikä bandeista kuuluu GLUT4:lle.



Kuvio 20. Abcam western blot-tulokset. Geeliä ja membraania tarkasteltaessa huomattiin, että vasta-aineella inkuboidussa membraanissa (oik.) näkyy täysin samat bandit kuin geelissä (vas.). (Kuvälähde: Helenius–Mikkonen 2017.)

## 9. Tulosten pohdinta

### 9.1 Virtausytometriatulosten pohdinta

Työn käytännön osuus toteutettiin 8 viikon jaksolla, jonka aikana oli tarkoitus kasvattaa soluviljelmiä sekä saada virtausytometriaprotokolla toimimaan. Tämä aika osoittautui kuitenkin melko lyhyeksi tavoitteiden saavuttamiselle, koska virtausytometria ei toiminutkaan odotusten mukaisesti. GLUT4-fluoresenssin intensiteetti (MFI) oli Santa Cruzilla värjätynä 2,245 kertainen insuliinistimuloituissa soluissa verrattuna basaalisoluihin (myoblastit). FITC:llä värjätessä tämä arvo oli vain 0,003, kun taas Abcamilla arvo oli moninkertainen, 921,996. Jokaista 10 000 laskettua solua kohti saatu elävien solujen osuus eli "counts" oli kaikissa mittauksissa hyvin matala, useimmiten vain noin 2–10 % luokkaa, mikä vaikuttaa negatiivisesti tulosten luotettavuuteen. Insuliinistimuloituilla soluilla countsit olivat lähes jokaisessa mittauksessa matalammat kuin basaalisoluilla.

Virtausytometriaa lähdettiin testaamaan Koshyn ym. (2010) julkaisussa käyttämän protokollan pohjalta. Käytännön syistä oli kuitenkin mahdotonta toistaa protokollaa täysin samanlaisena kuin aikaisemmassa tutkimuksessa. Käytimme menetelmän testauksessa ihmisten myoblasteja kuten alkuperäisessäkin julkaisussa, mutta solut olivat luonnollisesti peräisin eri koehenkilöistä. Tämä voi vaikuttaa tuloksiin, sillä ihmiset ovat yksilöllisiä ja solujen autofluoresenssin määrä vaihtelee (Koshy ym. 2010). Alkuperäisessä protokollassa käytettyä Santa Cruzin vasta-ainetta (SC-1606) ei ollut enää saatavilla, minkä vuoksi menetelmää testattiin kolmella eri vasta-aineella, joiden toimivuudesta ei ollut edeltävää tietoa. Tässä opinnäytetyössä käytetty Santa Cruzin vasta-aine oli SC-53566. Vasta-aineiden testaus virtausytometrialla oli kuitenkin rajallista sekä ajan että käytettävissä olevan vasta-aineen määrän vuoksi.

Virtausytometria on edullinen ja suhteellisen nopea menetelmä solujen analysointiin, mutta vaatii lähes 10-kertaiset vasta-ainepitoisuudet verrattuna moniin muihin menetelmiin. Lisäksi tässä opinnäytetyössä käytettävissä olleiden primaaristen humaanisolujen määrä oli rajallinen. Nämä tekijät yhdessä vasta-aineen heikkouden kanssa saattoivat olla syynä siihen, miksei menetelmä antanut järkeviä tuloksia. Menetelmää optimoidessa vasta-aineen optimaalinen määrä tulisi testata titraamalla. Titrauksen avulla saadaan

selville se määrä vasta-ainetta, millä saadaan aikaan maksimaalinen fluoresenssi ilman häiritsevää taustasignaalia. (Leinco Technologies Inc.)

Elävien solujen hyvin alhainen lukumäärä saattoi ainakin osittain johtua siitä, että solut eivät kestäneet käsittelyä ja menivät rikki jossakin kohtaa protokollaa. Solujen hajoaminen pystyttiin havaitsemaan analyysiohjelman piirtämästä sirontakuviosta, jossa ns. solujäänteet kertyivät kuvion vasempaan alalaitaan (Kuviot 12–15). Nämä kuolleet solut jätettiin pois tuloksista rajaamalla ne analysoitavien solupopulaatioiden ulkopuolelle. Elävien solujen alhainen lukumäärä herättää kysymyksen siitä, missä kohtaa protokollaa solut rikkoontuivat ja miten tämä olisi voitu estää. Odotetusti solujen määrä oli suurempi L6-soluilla, sillä kyseessä on kuolematon solulinja joka tuottaa paljon soluja. Solujen rikkoutuminen on saattanut tapahtua, kun soluja irrotettiin kuoppalevyiltä soluraaputtimen avulla. Tähän työvaiheeseen ei ollut saatavilla tarkkoja ohjeita, joten työvaiheessa jouduttiin tasapainottelemaan liian kevyen ja voimakkaan raaputuksen välillä. Liian kevyellä raaputuksella solut jäivät kiinni kuoppien pohjiin, jolloin soluja saatiin liian vähän analysoidavaksi. Yritettäessä saada enemmän soluja koeputkiin, voi olla, että raaputus oli liian voimakasta ja hajotti soluja, aiheuttaen saadut tulokset.

Insuliinistimuloitujen solujen vähäinen määrä ja niiden matala intensiteetti saattavat selittyä GLUT4-proteiinin hydrofobisuudella, eli taipumuksella hylkiä vettä (Nelson–Cox 2008: 392). Voidaan spekuloida, että solut, joissa GLUT4 on siirtynyt solun pinnalle, saostuvat kasoiksi hydrofobisten osien tarrautuessa toisiinsa. Tällaisessa tapauksessa insuliinistimuloituneet solut voisivat tarttua kiinni toisiinsa muodostaen isompia solurykelmiä, jotka eivät pääse läpi protokollassa käytetystä solusiivilästä. Näiden solukasojen jäädessä analyysin ulkopuolelle saatetaan menettää osa värjäytyneistä soluista. Tämä voisi selittää sen, miksi FITC vasta-aineella insuliinistimuloitujen solujen intensiteetti on matalampi kuin basaalisolujen, mutta ei toisaalta anna selitystä sille, että Santa Cruzilla ja Abcamilla värjättyinä solujen intensiteetit ovat toisinpäin eli insuliinistimuloitujen solujen intensiteetti on korkeampi kuin basaalisolujen.

Voi myös olla, että FITC vasta-aine ei jostain syystä ole toiminut käytetyssä menetelmässä, eikä ole tunnistanut tai värjännyt GLUT4-proteiinia. Tästä johtuen insuliinistimuloitujen solujen intensiteetti on matala siitä huolimatta, että niiden pinnalla on GLUT4-transportteireita. Basaalisolujen korkeampi intensiteetti FITC vasta-ainetta käytettäessä

herättää myös kysymyksiä vasta-aineen spesifisyydestä. Teoriassa insuliinistimuloituissa soluissa tulisi olla havaittavissa enemmän fluoresenssisignaalia kuin basaalissa.

## 9.2 Immunosytokemiallisen fluoresenssivärjäyksen tulosten pohdinta

Kuvista voidaan nähdä, että kaikki vasta-aineet ovat tunnistaneet GLUT4-transportterin ja se näkyy pieninä vihreinä pisteinä sytosolissa. Fluoresenssisignaalin voimakkuus kuitenkin vaihtelee vasta-aineiden välillä johtuen eri vasta-aineiden värjäysjäljen eroista. Kuvien perusteella vaikuttaisi siltä, että FITC -vasta-aine olisi herkempi kuin Santa Cruz ja toimisi täten paremmin immunosytokemiallisissa peitinlasivärjäyksissä. Abcamin vasta-aine oli puolestaan värjännyt myös taustan lähes kauttaaltaan, mikä teki kuvien ottamisesta haastavaa, sillä tummaa taustaa ei ollut näkyvissä lähes ollenkaan. Vasta-aine ei siis värjännyt yhtä spesifisesti kuin FITC ja Santa Cruz. Abcamin C-terminaalinen vasta-aine ei ollut tämän työn kannalta optimaalinen vaihtoehto soluvärjäyksiin, sillä se värjää myös sytosolissa ja vesikkeleissa olevan GLUT4:n, mikä tekee insuliinistimulaation vaikutuksen tarkastelemisesta vaikeaa. Sekundaari vasta-ainekontrollin taustalla näkyy hieman epäspesifistä vihreää värjäytymistä, joka ei kuitenkaan muistuta muissa näytteissä näkyvää pistemäistä värjäystä. Saattaa olla, että sekundaari vasta-aine tunnistaa epäspesifisesti soluissa myös jotakin muuta kuin primaari vasta-aineen.

Kuvista käy ilmi, että insuliinistimuloitujen ja basaalisolujen välillä ei ole säännönmukaista huomattavaa eroa GLUT4:n määrässä solukalvolla. Kuvien perusteella voidaan päätellä, että immunosytokemiallinen fluoresenssivärjäys ei ole tällaisenaan tarpeeksi herkkä metodi insuliinistimulaation havainnoimiseksi. Stimuloitujen ja basaalisolujen välisten erojen puuttuminen saattoi johtua myös käytetystä mikroskoopista. Solujen tarkasteluun käytettiin normaalia fluoresenssimikroskooppia, joka havaitsee signaalia myös fokustason ulkopuolelta. Tällöin ylä- ja alapuolelta leikkaustasoa tulee häiritsevää signaalia. Insuliinistimuloitujen ja basaalisolujen erojen tarkasteluun olisi ollut parempi käyttää konfokaalimikroskooppia, jota ei kuitenkaan ollut mahdollista hyödyntää tässä työssä. Konfokaalimikroskopiassa laservalo keskitetään tarkasti vain yhdelle fokustasolle ja kuvia otetaan peräkkäisistä leiketasoista. Muilta tasoilta tuleva häiritsevä signaali pystytään suodattamaan pois matemaattisten algoritmien avulla. (Solunetti.)

Ihanteellista olisi ollut, jos peitinlasivärjäykset olisi voitu tehdä saman henkilön soluille kaikilla kolmella eri vasta-aineella. Tämä olisi minimoinut yksilöllisen vaihtelun aiheuttamat erot fluoresenssin voimakkuudessa. Rajallisten resurssien vuoksi soluja tai vasta-aineita ei ollut tarpeeksi tämän toteuttamiseksi. Vasta-aineen spesifisyyttä olisi ollut tarpeen arvioida myös täysin negatiivisella kontrollilla, eli käyttäen sellaisia soluja, jotka eivät ilmennä ollenkaan GLUT4-proteiinia. Tällaisten solujen saaminen on kuitenkin haasteellista, sillä GLUT4-transportteria ilmennetään jonkin verran melkein kaikissa tunnetuissa viljeltävissä soluissa.

Peitinlasit kuvattiin käyttäen mahdollisimman tarkasti samaa valotusaikaa. Kuvien intensiteettiä ja kontrastia muokattiin Fiji-kuvankäsittelyohjelmalla, jotta kuvat saatiin helpommin esitettävään ja tulkittavaan muotoon. Jokaista kuvaa muokattiin samalla tavalla, jolloin niiden väliset erot pysyivät muuttumattomana ja kuvien luotettavuus säilyi.

### 9.3 Western blot-tulosten pohdinta

FITC ja Santa Cruz olivat tunnistaneeet kohdeproteiininsa GLUT4:n Western blotissa. Santa Cruzilla saatu bandi oli selvästi haaleampi kuin FITC vasta-aineella saatu, eli FITC tunnisti herkemmin kohdeproteiininsa. Toisaalta Santa Cruz oli spesifisempi, sillä se ei aiheuttanut ylimääräisiä bandeja membraanille toisin kuin FITC vasta-aine.

Abcamin vasta-aineen tuloksia tarkasteltaessa huomattiin, että värjäämättömällä geelillä ja vasta-aineessa inkuboidulla membraanilla näkyvillä bandeilla ei ollut mitään eroa. Tämä tarkoittaa, että vasta-aine värjää epäspesifisesti kaikkia solun proteiineja, jolloin yksittäistä GLUT4:lle kuuluvaa bandia ei pystytä erottamaan. Abcamin vasta-aineen epäspesifisyys saattaa johtua ainakin osittain polyklonaalisuudesta. Polyklonaalisten vasta-aineiden spesifisyys on heikompaa, jolloin saattaa syntyä ristireaktioita (Pacific Immunology).

## 10. Johtopäätökset

Virtausytometriaa lähdettiin testaamaan aiemman julkaisun pohjalta, mutta sitä ei saatu toimimaan odotetulla tavalla. Täten menetelmän toimivuus GLUT4-translokaation tutkimisessa jäi vielä epäselväksi. Virtausytometriassa parhaat tulokset saatiin Santa Cruzin vasta-aineella, jolla tulokset olivat samansuuntaiset sekä humaani- että L6-soluilla.



Tämä vasta-aine tuntuisi sopivan menetelmään parhaiten testatuista vasta-aineista. FITC vasta-aine puolestaan ei välttämättä sovi tähän menetelmään kovin hyvin, sillä sen toimivuus ja spesifisyys on saatujen tulosten perusteella kyseenalainen. Tulevaisuudessa testattavien vasta-aineiden spesifisyys tulisi tarkastaa käyttämällä täysin negatiivisia kontrollisoluja, jotka eivät ilmennä lainkaan GLUT4-proteiinia.

Virtaussytometriaa tulisi tulevaisuudessa optimoida lisää kasvattamalla elävien solujen lukumäärää ja selvittämällä sopiva vasta-ainepitoisuus titraamalla. Protokollan yksityiskohtiin tulee kiinnittää huomiota, esimerkiksi onko solusiivilän käyttö välttämätöntä. Kaiken kaikkiaan menetelmän testaukseen tulee varata paljon aikaa, jota tämän opinnäytetyön puitteissa ei ollut tarpeeksi.

Myös vasta-aineiden validoinnissa Santa Cruzin vasta-aine osoittautui toimivimmaksi. Western blotissa Santa Cruz- ja FITC-vasta-aine tunnistivat kohdeproteiininsa GLUT4:n. FITC oli vasta-aineista herkempi, mutta Santa Cruz osoittautui spesifisemmäksi. Myös peitinlasivärjäyksissä FITC osoittautui Santa Cruzia herkemäksi vasta-aineeksi ja siten se sopii ehkä parhaiten kyseiseen menetelmään. Abcamin vasta-aine puolestaan näytti värjäävän epäspesifisesti lähes kaiken, mitä tukee myös vasta-aineella saatu western blot-tulos. Immunosytokemiallisessa fluoresenssivärjäyksessä ei todettu eroja insuliinistimuloitujen ja basaalisolujen välillä, joten menetelmä ei ehkä tällaisenaan ole riittävän herkkä osoittamaan insuliinistimulaation vaikutusta. Lisäksi käytetty mikroskooppi ei ollut tarkoitukseen paras mahdollinen.

On mahdollista, että virtaussytometriaa voidaan tulevaisuudessa käyttää suomalaisspesifisen AKT2-geenivariantin tutkimisessa, mutta tämä vaatii enemmän menetelmän optimointia sekä testausta. Tämä opinnäytetyö antaa kuitenkin hyvän pohjan mahdollisille jatkotutkimuksille.

## **11. Luotettavuus ja eettisyys**

### 11.1 Luotettavuus

Opinnäytetyön käytännön työn aikana noudatettiin laboratorion työtapoja sekä Minervan omia käytäntöjä koskien laboratoriotyöskentelyä. Työn laatuun kiinnitettiin huomiota ja

pyrittiin tarkkuuteen sekä huolellisuuteen kaikissa työvaiheissa luotettavuuden takaamiseksi. Kaikki näyteputket ja viljelypullot merkattiin huolellisesti OMB-koodeilla sekaannuksien välttämiseksi ja solujen ristikontaminaatiota vältettiin käyttämällä aina puhtaita työvälineitä. Koska meillä ei missään vaiheessa ollut tietoa näytteiden antaneista ihmisistä tai heidän taustoistaan, nämä seikat eivät millään tavalla voineet vaikuttaneet saattuihin tuloksiin tai tapaan käsitellä näytteitä.

Ennen työskentelyä perehdyimme taustatietoon ja noudatimme menetelmien protokollia huolellisesti. Opinnäytetyön aikana dokumentoitiin kaikki työskentely ja pidettiin kirjaa eri protokollista sekä niihin tehdyistä muutoksista. Työskentely tapahtui tiiviissä vuorovaikutuksessa ohjaaja Selina Mäkisen kanssa, joka oli ajan tasalla työn etenemisestä ja saaduista tuloksista.

Virtausytometriatulosten luotettavuus voidaan kyseenalaistaa, sillä analyysiin saatujen solujen määrä oli hyvin matala, joka vaikutti myös soluista mitattuun fluoresenssin intensiteettiin. Elävien solujen osuus 10 000 laskettua solua kohti oli välillä vain muutaman prosentin luokkaa. Näin alhaisesta määrästä analysoituja soluja on mahdotonta vetää varmoja johtopäätöksiä. Lisäksi Abcamin vasta-aineen ja FITC vasta-aineen kohdalla nousi esiin epäily vasta-aineen spesifisyydestä. Mikäli vasta-aine tunnistaa muutakin kuin kohdeproteiininsa, sillä saatuihin tuloksiin tulisi suhtautua varauksella. Luotettavuuden parantamiseksi olisi voitu kokeilla eri vasta-aineita tai käyttää enemmän aikaa menetelmän optimointiin. Työn toteuttamiseen varattu aika ei kuitenkaan mahdollistanut tätä.

## 11.2 Eettisyys

Etiikka määritellään filosofian osa-alueeksi, joka tutkii hyvää, pahaa sekä moraalista toimintaa (Tieteen termipankki 2017). Bioanalytikko noudattaa työssään terveydenhuollon yleisten eettisten periaatteiden lisäksi kliinisen laboratoriotyön eettisiä periaatteita. Kliinisen laboratoriotyön periaatteista olennaisimpia opinnäytetyömme kannalta ovat salassapitovelvollisuus, tutkimusten laadusta ja luotettavuudesta huolehtiminen, näyttemateriaalin käsittely luovuttajan yksityisyyttä ja oikeuksia kunnioittaen, vastuun ottaminen omasta toiminnasta sekä ammatin luotettavuuden ja arvostuksen ylläpito. (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2006.)

Tässä opinnäytetyössä hyödynnettiin vapaaehtoisilta koehenkilöiltä kerättyjä biopsioita eli koepaloja. Ihmisten tutkimisessa tarvitaan tutkittavalta suostumus ja tutkimuksen haittoja tulee verrata odotettavissa olevaan hyötyyn. Ihmiseen kohdistuvasta tutkimuksesta on säädetty laissa ja asetuksessa. (ETENE ym. 2006: 3.) Lääketieteellisellä tutkimuksella tarkoitetaan tutkimusta, jossa puututaan ihmisen koskemattomuuteen ja jonka tarkoituksena on lisätä tietoa terveydestä, sairauksien syistä, oireista, diagnostiikasta, hoidosta, ehkäisystä tai tautien olemuksesta yleensä (Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 488/1999 § 2.)

Tutkimustyön etiikkaan liittyy olennaisesti se, että tutkimustyössä noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä. Vastuu tästä kuuluu jokaiselle tutkimusryhmän jäsenelle ja koko tiedeyhteisölle. Hyvän tieteelliseen käytäntöön kuuluu rehellisyys, tarkkuus ja huolellisuus tutkimustyössä, tulosten esittämisessä ja arvioinnissa. Tutkimusetiikan mukaisesti muiden tutkijoiden saavutukset on otettava huomioon ja niihin on viitattava asianmukaisesti, eli kenenkään tutkimustyötä ei saa kopioida omakseen. Hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti etenevä tutkimusprosessi noudattaa tieteelliselle tutkimukselle asetettuja vaatimuksia tutkimuksen suunnittelussa, toteutuksessa ja raportoinnissa. Ennen tutkimuksen aloittamista tulee hakea tutkimuslupa ja laatia eettinen ennakkoarviointi. Tutkimuksessa käytettävien menetelmien tulee olla eettisesti kestäviä ja tutkittavien tietosuoja on huomioitava. Tutkimuksen tuloksia ei saa vääristellä tai sepittää ja tulokset tulee julkaista avoimesti. (Helsingin yliopisto.)

## Lähteet

Abcam a. Anti-Glucose Transporter GLUT4 Antibody (ab654). Vasta-aineen tuoteseloste. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.abcam.com/glucose-transporter-glut4-antibody-ab654.html>>

Abcam b. Direct vs indirect immunofluorescence. Understand the difference between direct and indirect methods for immunofluorescence. Verkkodokumentti. <<http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>> Luettu 20.7.2017

Abcam c. Introduction to flow cytometry. Verkkodokumentti <<http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>> Luettu 20.9.2017

Abcam d. Western Blotting - A beginner's guide. Työohje. Saatavilla myös sähköisesti <<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:j0kHdtJMcX0J:https://www.researchgate.net/file.Post-FileLoader.html%3Fid%3D591ff4cbf7b67e8d8176a907%26asset-Key%3DAS%253A495997835018240%25401495266507346+%&cd=1&hl=fi&ct=clnk&gl=fi>>

Aviva Systems Biology. SLC2A4 antibody - N-terminal region (ARP43785\_P050). Vasta-aineen tuoteseloste. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.avivasysbio.com/en/slc2a4-antibody-n-terminal-region-arp43785-p050.html>>

Bio Rad a. Detection Methods. Verkkodokumentti. <<http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/detection-methods>> Luettu 8.9.2017

Bio Rad b. Flow Cytometry Basics Guide. Verkkodokumentti. <<https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2017/flow/flow-cytometry-basics-guide.pdf>> Luettu 22.9.2017

Chemicon International 2004. Introduction to antibodies. Verkkodokumentti. <[http://www.ahdiagnostics.dk/Files/Filer/Chemicon/Intro\\_to\\_Antibodies\\_Chemicon.pdf](http://www.ahdiagnostics.dk/Files/Filer/Chemicon/Intro_to_Antibodies_Chemicon.pdf)> Luettu 22.9.2017

Diabetesliitto a. Diabetes on monta diabetesta. Verkkodokumentti. <[https://www.diabetes.fi/diabetes/yleista\\_diabeteksesta](https://www.diabetes.fi/diabetes/yleista_diabeteksesta)> Luettu 16.10.2017

Diabetesliitto b. Mitä tarkoittaa diabetes Suomessa? Verkkodokumentti. <[https://www.diabetes.fi/yhteiso/medialle/perustietoa\\_diabeteksesta\\_suomessa](https://www.diabetes.fi/yhteiso/medialle/perustietoa_diabeteksesta_suomessa)> Luettu 22.2.2017

ETENE = Valtakunnallinen sosiaali- ja terveystieteiden neuvottelukunta

TUKIJA = Valtakunnallinen lääketieteellinen tutkimuseettinen toimikunta

TENK = tutkimuseettinen neuvottelukunta

BTNK = Biotekniikan neuvottelukunta

GTLK = Geenitekniikan lautakunta

KYTÖ = Koe-eläintutkimuksen yhteistyöryhmä

ETENE–TUKIJA–TENK–BTNK–GTLK–KYTÖ 2006. Tutkimuksen eettinen arviointi Suomessa. Raportti. Saatavilla myös sähköisesti <<http://etene.fi/documents/1429646/1559078/Tutkimuksen+eettinen+arviointi+Suomessa.pdf/6c447b41-39f8-43b5-96f2-1c22f871d8b>>

FDA = U.S. Food and Drug Administration

FDA 2001. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Verkkodokumentti <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>> Luettu 20.7.2017

Genscript. Antibody handbook with Focus on Recombinant Antibodies and Antibody Drug Discovery. Verkkodokumentti.<[https://www.genscript.com/gfiles/techfiles/antibody\\_handbook.pdf](https://www.genscript.com/gfiles/techfiles/antibody_handbook.pdf)> Luettu 5.9.2017

Helsingin yliopisto. Tutkimusetiikka. Verkkodokumentti <<https://www.helsinki.fi/fi/tutkimus/tutkimusymparisto/tutkimusetiikka>>. Luettu 5.4.2017

Huang, Shaohui–Czech, Michael P. 2007. The GLUT4 glucose transporter. Cell Metabolism 5 (4). 237–252. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413107000678>>

Højlund, Kurt 2014. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. Danish Medical Journal 61 (7). 1–26. Saatavilla myös sähköisesti <[http://www.danmedj.dk/portal/page/portal/danmedj.dk/dmj\\_for-side/PAST\\_ISSUE/2014/DMJ\\_2014\\_07/B4890](http://www.danmedj.dk/portal/page/portal/danmedj.dk/dmj_for-side/PAST_ISSUE/2014/DMJ_2014_07/B4890)>

Koshy, Shyny–Alizadeh, Parema–Timchenko, Lubov T.–Beeton, Christine 2010. Quantitative Measurement of GLUT4 Translocation to the Plasma Membrane by Flow Cytometry. Verkkodokumentti. <<http://www.jove.com/video/2429/quantitative-measurement-glut4-translocation-to-plasma-membrane-flow>>. Luettu 15.02.2017.

Laakso, Markku 2007. Diabetes - glukoosiainevaihdunnan säätelyn perinnöllinen häiriö. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 123 (18). 2195-2204. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.duodecimlehti.fi/lehti/2007/18/duo96767>>

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 488/1999. Säädetty 9.4.1999.

Leinco Technologies Inc. Titration and Antibodies – The Basics Flow Cytometry Staining Protocol. Työohje. Verkkodokumentti. <<https://www.leinco.com/library/Titration-for-FACS.pdf>>

Lipman, Neil S. – Jackson, Lynn R. – Trudel, Laura J. – Weis-Garcia, Frances 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. Institute for Laboratory Animal Research Journal 46 (3). 258–268. Saatavilla myös sähköisesti <<https://academic.oup.com/ilarjournal/article-lookup/doi/10.1093/ilar.46.3.258>>

Maity, Biswanath – Sheff, David – Fisher, Rory 2013. Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments. Methods in Cell Biology 113. 81-105.

Manning, Alisa ym. 2017. A Low-Frequency Inactivating AKT2 Variant Enriched in the Finnish Population Is Associated With Fasting Insulin Levels and Type 2 Diabetes Risk. *Diabetes* 66 (7). 2019–2032.

Manning, Brendan D. – Cantley, Lewis C. 2007. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129 (7). 1261–1272. Saatavilla myös verkossa <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2756685/>>

Mueckler, Mike – Thorens, Bernard 2013. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 34 (0). 121–138. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4104978/>>

Nelson, David L.–Cox, Michael M. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry* 5th edition. W.H. Freeman and Company (New York). 392.

Niskanen, Leo 2014. Tyypin 2 diabeteksen yleisyys. Verkkodokumentti. <[http://www.ebm-guidelines.com/dtk/syd/avaa?p\\_artikkeli=syd00334](http://www.ebm-guidelines.com/dtk/syd/avaa?p_artikkeli=syd00334)> Luettu 23.8.2017

Pacific Immunology. Polyclonal vs Monoclonal Antibodies. Verkkodokumentti. <<https://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies/>> Luettu 25.9.2017

Reusch, William 2013. Peptides & proteins. Verkkodokumentti. <<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/protein2.htm>> Luettu 16.10.2017

Santa Cruz Biotechnology, Inc. Glut4 (IF8): sc-53566. Vasta-aineen tuoteseloste. Saatavilla myös sähköisesti <<https://datasheets.scbt.com/sc-53566.pdf>>

Saraheimo, Markku 2011. Mitä diabetes on? Teoksessa Sane, Timo (toim.): *Diabetes*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 9-25.

Solunetti. Konfokaalimikroskopia. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubio-logia/konfokaalimikroskopia/2>> Luettu 11.9.2017

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2006. Bioanalytiikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Verkkodokumentti <<https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011.pdf>> Luettu 5.3.2017

Taniguchi, Cullen M. – Emanuelli, Brice – Kahn. C. Ronald 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2). 85–96.

Thermo Fisher Scientific. Blocker™ BSA (10x) in TBS. Käyttöohje. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/37520>>

Tieteen termipankki 2017. Filosofia: etiikka. Verkkodokumentti. <<http://tieteentermipankki.fi/wiki/Filosofia:etiikka>> Luettu 18.10.2017

Virkamäki, Antti 2011. Insuliiniresistenssin taustatekijät. Teoksessa Sane, Timo (toim.): *Diabetes*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 34.

Wilcox, Gisela 2005. Insulin and Insulin Resistance. *The Clinical Biochemist Reviews* 6 (2). 19–39. Saatavilla myös sähköisesti <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/>>