

## imWilms1 rakud | 300412

## Üldine teave

## Description

Wilms1 rakuliin on algselt saadud Wilmsi primaarsest kasvajast, mis saadi patsiendilt, kellel diagnoositi suured kahepoolsed neerukasvajad, mis on Wilmsi kasvaja (nefroblastoomi) iseloomulik esinemisviis. Selles rakuliinis on homosügootne mõttetu mutatsioon WT1 geenis (c.149 C>A, p.S50X), mis põhjustab kärbitud, mittefunktsionaalse WT1 valgu teket. WT1 on neerude arengus kriitilise tähtsusega geen ja selle mutatsioon on tihedalt seotud Wilmsi kasvaja patogeneesiga, eriti stromaalse diferentseerumisega kasvajate puhul. Wilms1 rakkudel on stabiilne kariotüüp ilma oluliste kromosoomianomaaliateta ning neid iseloomustab mesenhüümne fenotüüp, mis ekspresseerib vimentini, kuid millel puuduvad epiteeli markerid, nagu tsütokeratiin. Liinil on piiratud, kuid märkimisväärne võime mesenhüümiliseks diferentseerumiseks, sealhulgas võime diferentseeruda teatud tingimustel lihasarnasteks rakkudeks, mis muudab selle oluliseks mudeliks WT1 mutatsioonide molekulaarsete tagajärgede uurimiseks.

Et ületada primaarsete Wilms1-rakkude piiratud eluiga, loodi imWilms1 rakuliin, viies algsetesse kasvajarakkudesse sisse kolmekordse mutandi SV40 suure T antigeeni (U19dI89-97tsA58), mis hõlbustab nende immortaliseerimist. See modifikatsioon võimaldab imWilms1 rakkudel piiramatult paljuneda, säilitades samal ajal kromosomaalse stabiilsuse, pakkudes seega usaldusväärset mudelit pikaajalisteks uuringuteks. Immortaliseeritud imWilms1-rakkudel on jätkuvalt sama WT1-mutatsioon ja nad säilitavad Wilms1 vanemliini mesenhüümilised omadused.

Lisaks geneetilistele ja fenotüüpilistele omadustele on imWilms1 rakuliini ulatuslikult analüüsitud selle signaaliradade aktiivsuse suhtes. Proteoomilised uuringud on näidanud mitmete retseptoritürosiini kinaaside (RTK), sealhulgas EGFR, PDGFR $\beta$  ja AXL fosforüleerimist ja aktiveerimist ning MAPK-signaaliradade allavoolu aktiveerimist. Nende radade järjepidev aktiveerimine imWilms1 rakkudes rõhutab nende tähtsust Wilmsi kasvaja sihtotstarbeliste ravistrateegiate uurimisel. Üldiselt on imWilms1 usaldusväärne ja pikaajaline mudel Wilmsi kasvaja arengu ja progresseerumise aluseks olevate molekulaarsete mehhanismide uurimiseks, eriti nende, mis on tingitud WT1 mutatsioonidest ja kõrvalekalduvatest signaaliradadest.

**Organism** Inimene

**Tissue** Neerud

**Disease** Wilmsi kasvaja

**Synonyms** IM-WT-1

## Omadused

**Age** 10 kuud

**Gender** Naised

**Ethnicity** Kaukaasia

## imWilms1 rakud | 300412

**Morphology** Spindlikujuline

**Cell type** Wilmsi rakud

**Growth properties** Kinnipeetav

## Regulatiivsed andmed

**Citation** imWilms1 (Cytioni katalooginumber 300412)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**CellosaurusAccession** CVCL\_A5SN

**GMO Status** GMO-S1: See imWilms1 inimese Wilmsi kasvaja liin sisaldab kolmekordselt mutantset SV40 T-antigeeni kassetti, mis võimaldab tingimuslikku immortaliseerimist nefroblastoomi uurimiseks. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

## Biomolekulaarsed andmed

**Mutational profile** WT1 mutatsiooni staatus: homosügootne c. 149 C>A, p.S50x, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1 mutatsiooni staatus: heterosügootne TCT>TTT, p.S45F

## Töötlemine

**Culture Medium** MSCGM komplekt (Lonza)

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Eemaldage kleepunud rakkudel vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.

**Fluid renewal** 1 kuni 2 korda nädalas

## imWilms1 rakud | 300412

**Freeze medium**

Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Veenduge, et vialid jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , et tagada rakkude tervikluse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja kohe kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage vialid kiiresti, kastes selle  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud vialid ettevaatlikult ja viige rakususpensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu 300 x g juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärseid katsetulemusi.

**Incubation Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , niisutatud atmosfäär.

**Flask Coating**

Puudub

**Freezing Procedure**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

## imWilms1 rakud | 300412

### Shipping Conditions

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

### Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

## Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

### Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminescentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.

### HLA alleles

**A\***: '03:01:01, '24:02:01  
**B\***: '35:03:01, '38:01:01  
**C\***: '12:03:01  
**DRB1\***: '07:01:01, '14:54:01  
**DQA1\***: '01:04:01, '02:01:01  
**DQB1\***: '02:02:01, '05:03:01  
**DPB1\***: '02:01:02G, '04:02:01G  
**E**: '01:03:01, '01:03:02