

**Wilms3 ląstelės | 300414****Bendra informacija****Description**

Wilms3 ląstelių linija buvo sukurta iš pirminio Vilmsio naviko, kuris buvo diagnozuotas pediatrišiam pacientui ir kuriam buvo būdinga somatinė WT1 mutacija. Skirtingai nuo daugelio kitų Vilmsio naviko ląstelių linijų, "Wilms3" turi heterozigotinę WT1 geno mutaciją (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), dėl kurios susidaro sutrumpintas WT1 baltymas. Šis dalinis WT1 funkcijos praradimas yra susijęs su stromos arba mezenchiminio fenotipo navikų vystymusi. Tačiau WT1 mutacija Wilms3 nėra homozigotinė, o tai dar labiau apsunkina tyrimą, nes ji išlaiko tam tikrą WT1 funkciją, kuri gali skirtingai paveikti naviko biologiją, palyginti su ląstelių linijomis, visiškai praradusiomis WT1.

Wilms3 taip pat turi CTNNB1 geno mutaciją, ypač pažeidžiančią 41 treoniną (p.T41A), kuris atlieka svarbų vaidmenį Wnt signalų kelyje. Ši mutacija stabilizuoja  $\beta$ -kateniną, neleidžia jam skaidytis ir lemia konstitucinį Wnt kelio aktyvumą. Nuolatinis Wnt signalo aktyvavimas skatina ląstelių proliferaciją ir prisideda prie Wilms3 navikų susidarymo, todėl šis virusas yra pagrindinis CTNNB1 mutacijų poveikio iš dalies veikiančio WT1 fono kontekste tyrimo modelis.

Fenotipiškai Wilms3 ląstelės pasižymi mezenchimine morfologija, jose ekspresuojamas vimentinas ir trūksta citokeratino, o tai atitinka pirminio naviko stromos savybes. Šios ląstelės pasižymi ribotu diferenciacijos potencialu, o tam tikromis sąlygomis gali pereiti tam tikrą mezenchiminę diferenciaciją. Atlikus Wilms3 proteominę analizę paaiškėjo, kad aktyvuotos kelios receptorių tirozino kinazės (RTK), įskaitant PDGFR $\beta$  ir AXL, kurios palaiko ląstelių išlikimą ir proliferaciją. Be to, suaktyvėja tolesni signaliniai keliai, tokie kaip MAPK ir PI3K/AKT, todėl sustiprėja piktybinės Wilms3 ląstelių savybės.

Išskirtinis Wilms3 aspektas yra dalinis WT1 funkcionalumas, kuris leidžia suprasti, kaip WT1 mutacijos prisideda prie Wilmsio naviko biologijos, kai mutacija nėra visiška. WT1 ir Wnt signalų sąveika Wilms3 sistemoje suteikia vertingą galimybę ištirti šių kelių niuansų vaidmenį naviko vystymuisi. Apskritai Wilms3 yra svarbus modelis, kuriuo galima tirti molekulinis mechanizmus, lemiančius Wilmsio naviko atsiradimą, kai yra dalinis WT1 praradimas ir konstitucinis Wnt kelio suaktyvėjimas.

**Organism** Žmogus**Tissue** Inkstai**Disease** Vilmsio navikas**Applications** In vitro ląstelių kultūros modelis. Biocheminiai tyrimai**Charakteristikos****Age** 11-12 mėnesių**Gender** Vyras**Ethnicity** Kaukazičių

**Wilms3 ląstelės | 300414****Morphology** Verpstės formos**Cell type** Vilmsio ląstelės**Growth properties** Prigludęs**Reguliavimo duomenys****Citation** Wilms3 (Cytion katalogo numeris 300414)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_A5SF**Biomolekuliniai duomenys****Mutational profile** WT1 mutacijos būklė: homozigotinė c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1 mutacijos būklė: laukinis tipas**Tvarkymas****Culture Medium** MSCGM rinkinys (iš "Lonza")**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkelkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.**Freeze medium** Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

## Wilms3 ląstelės | 300414

### Thawing and Culturing Cells

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei  $-150^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į  $37^{\circ}\text{C}$  temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

### Incubation Atmosphere

$37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , drėkintoje atmosferoje.

### Flask Coating

Nėra

### Freezing Procedure

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug  $-78^{\circ}\text{C}$  temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

### Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug  $-78^{\circ}\text{C}$  temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

## Wilms3 ląstelės | 300414

### Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystą azotą.

## Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

### Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.

### HLA aleliai

**A\***: '03:01:01  
**B\***: '35:01:01, '35:03:01  
**C\***: '04:01:01  
**DRB1\***: '04:03:01, '11:04:01  
**DQA1\***: '03:01:01, '05:05:01  
**DQB1\***: '03:01:01, '03:02:01  
**DPB1\***: '01:01:01, '04:01:01  
**E**: '01:03:02, '01:06:01