

## imWilms1 ląstelės | 300412

## Bendra informacija

## Description

Wilms1 ląstelių linija iš pradžių buvo gauta iš pirminio Vilmsio naviko, gauto iš paciento, kuriam buvo diagnozuoti dideli abipusiai inkstų navikai, būdingi Vilmsio navikui (nefroblastomai). Ši ląstelių linija turi homozigotinę WT1 geno beprasmę mutaciją (c.149 C>A, p.S50X), dėl kurios susidaro sutrumpintas, nefunkcionalus WT1 baltymas. WT1 yra labai svarbus genas inkstų vystymuisi, o jo mutacija yra glaudžiai susijusi su Vilmsio naviko patogenezė, ypač stromos diferenciacija pasižyminčiuose navikuose. Wilms1 ląstelės pasižymi stabilium kariotipu be reikšmingų chromosomų anomalijų, joms būdingas mezenchiminis fenotipas, jose ekspresuojamas vimentinas, tačiau nėra epitelio žymenų, pavyzdžiui, citokeratino. Ši linija pasižymi ribotu, bet reikšmingu mezenchiminės diferenciacijos gebėjimu, įskaitant galimybę tam tikromis sąlygomis diferencijuotis į raumenines ląsteles, todėl ji yra labai svarbus modelis WT1 mutacijų molekulinėms pasekmėms tirti.

Siekiant įveikti ribotą pirminių Wilms1 ląstelių gyvavimo trukmę, buvo sukurta imWilms1 ląstelių linija, į pirmines naviko ląsteles įterpiant trigubą mutavusį SV40 didelį T antigeną (U19dl89-97tsA58) ir taip palengvinant jų imortalizaciją. Ši modifikacija leidžia imWilms1 ląstelėms daugintis neribotą laiką, išlaikant chromosomų stabilumą, todėl tai yra patikimas ilgalaikių tyrimų modelis. Imortalizuotos imWilms1 ląstelės ir toliau pasižymi ta pačia WT1 mutacija ir išlaiko mezenchimines pirminės Wilms1 linijos savybes.

Be genetinių ir fenotipinių savybių, imWilms1 ląstelių linija buvo išsamiai ištirta dėl jos signalinio kelio aktyvumo. Proteominiai tyrimai atskleidė kelių receptorių tirozino kinazių (RTK), įskaitant EGFR, PDGFRβ ir AXL, fosforilinimą ir aktyvinimą, kartu su tolesniu MAPK signalinių kelių aktyvinimu. Nuolatinis šių kelių aktyvavimas imWilms1 ląstelėse pabrėžia jų svarbą tiriant tikslines Vilmsio naviko gydymo strategijas. Apskritai imWilms1 yra patikimas ir ilgalaikis modelis, kuriuo galima tirti molekulinis mechanizmus, lemiančius Vilmsio naviko vystymąsi ir progresavimą, ypač tuos, kuriuos lemia WT1 mutacijos ir pakitę signaliniai keliai.

**Organism** Žmogus

**Tissue** Inkstai

**Disease** Vilmsio navikas

**Synonyms** IM-WT-1

## Charakteristikos

**Age** 10 mėnesių

**Gender** Moteris

**Ethnicity** Kaukaziečių

**Morphology** Verpstės formos

**Cell type** Vilmsio ląstelės

## imWilms1 ląstelės | 300412

**Growth properties** Prigludęs

## Reguliavimo duomenys

**Citation** imWilms1 (Cytion katalogo numeris 300412)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**CellosaurusAccession** CVCL\_A5SN

**GMO Status** GMO-S1: šioje imWilms1 žmogaus Vilmsio naviko linijoje yra trigubai mutavusi SV40 T-antigeno kasetė, leidžianti sąlyginai imortalizuoti nefroblastomos tyrimams. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

## Biomolekuliniai duomenys

**Mutational profile** WT1 mutacijos būklė: homozigotinė c. 149 C>A, p.S50x, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1 mutacijos būklė: heterozigotinė TCT>TTT, p.S45F

## 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.

**Fluid renewal** 1-2 kartus per savaitę

**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.

## imWilms1 ląstelės | 300412

### 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 perkelkite 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

Kad po atšildymo būtų užtikrintas optimalus prisitvirtinimas ir gyvybingumas, rekomenduojame naudoti **kolagenu dengtas kolbas arba plokšteles**.

### 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 perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

## imWilms1 ląstelės | 300412

### Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78 °C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

### 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, '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