

**Wilms8 ląstelės | 300416****Bendra informacija****Description**

Wilms8 ląstelių linija buvo gauta iš pirminio Vilms naviko, kuris buvo diagnozuotas vaikui, sergančiam WT1 mutacija. Šiai ląstelių linijai būdinga homozigotinė nonsenso mutacija WT1 gene (c.1168 C>T, p.R390X), dėl kurios visiškai prarandama WT1 funkcija. WT1 yra labai svarbus normaliam inkstų vystymuisi, o jo inaktyvacija yra būdinga tam tikriems agresyviems Vilms naviko potipiems, ypač tiems, kuriems būdinga mezenchiminė diferenciacija. Todėl Wilms8 yra vertingas WT1 praradimo poveikio naviko genezei tyrimo modelis, ypač atsižvelgiant į Wilms navikus, kurie atsiranda su ryškiu stromos komponentu.

Be WT1 mutacijos, Wilms8 ląstelėse yra CTNNB1 geno mutacija (p.S45A), kuri koduoja  $\beta$ -kateniną, pagrindinį Wnt signalinio kelio reguliatorių. Mutacija ties 45 serinu sutrikdo įprastą fosforilavimo procesą, dėl kurio  $\beta$ -Cateninas skaidomas, todėl jis stabilizuojasi ir kaupiasi branduolyje. Dėl to konstituciškai aktyvuojamas Wnt signalas, kuris skatina ląstelių proliferaciją ir prisideda prie Wilms8 ląstelių linijos onkogeninių savybių. Dėl WT1 praradimo ir aberantinio Wnt signalo sąveikos Wilms8 yra labai svarbus modelis, padedantis suprasti molekulinis mechanizmus, kuriais grindžiami šie Wilms naviko biologijos keliai.

Wilms8 ląstelėms būdingas mezenchiminis fenotipas, kuriam būdinga vimentino raiška ir epitelio žymenų, tokių kaip citokeratinas, nebuvimas. Tai atitinka stromos diferenciaciją, pastebėtą pirminiame navike. Ląstelės pasižymi ribotu gebėjimu toliau mezenchimiškai diferencijuotis, pavyzdžiui, tam tikromis sąlygomis formuoti į raumenis panašias ląsteles. Atlikus Vilms8 proteominę analizę, nustatyta, kad aktyvuotos kelios receptorių tirozino kinazės (RTK), įskaitant PDGFR $\beta$  ir AXL, kurios dalyvauja tokiuose svarbiuose procesuose kaip ląstelių išlikimas, migracija ir proliferacija. Tolesnių signalinių kelių, ypač MAPK ir PI3K/AKT kelių, aktyvinimas dar labiau prisideda prie agresyvių Wilms8 ląstelių savybių.

Apskritai Wilms8 ląstelių linija yra labai svarbi priemonė tiriant Wilms naviko, kurį lemia WT1 praradimas ir pakitęs Wnt signalas, molekulinis pagrindus. Dėl jos genetinių ir fenotipinių savybių ji yra patikima platforma šių svarbių kelių sąveikai tirti ir galimiems Vilms navikų, turinčių stromos komponentą, gydymo taikiniams nustatyti.

**Organism** Žmogus**Tissue** Inkstai**Disease** Vilms navikas**Applications** In vitro ląstelių kultūros modelis. Biocheminiai tyrimai**Charakteristikos****Age** 8 mėnesiai**Gender** Vyras**Ethnicity** Kaukazičių

**Wilms8 ląstelės | 300416****Morphology** Verpstės formos**Cell type** Vilmsio ląstelės**Growth properties** Prigludęs**Reguliavimo duomenys****Citation** Wilms8 (Cytion katalogo numeris 300416)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_A5SJ**Biomolekuliniai duomenys****Mutational profile** WT1 mutacijos būklė: homozigotinė c.1168C>T, p.390x, LOH: , CTNNB1 mutacijos būklė: heterozigotinė TCT>GCT, p.S45A**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 perkeltite 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.

## Wilms8 ląstelės | 300416

### 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.

## Wilms8 ląstelės | 300416

### 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 skystąjį 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\***: '02:01:01, '03:01:01

**B\***: '15:01:01, '37:01:01

**C\***: '04:01:01, '06:02:01

**DRB1\***: '08:01:01G, '11:01:01

**DQA1\***: '04:01:01, '05:05:01

**DQB1\***: '03:01:01, '04:02:01

**DPB1\***: '03:01:01, '06:01:01

**E**: '01:03:02