

## Wilms3-solut | 300414

## Yleisiä tietoja

## Description

Wilms3-solulinja perustettiin pediatriksen potilaan primaarisesta Wilmsin kasvaimesta, jolle oli ominaista somaattinen WT1-mutaatio. Toisin kuin monissa muissa Wilmsin kasvainsolulinjoissa, Wilms3:ssa on heterotsygoottinen frameshift-mutaatio WT1-geenissä (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), joka johtaa tyypistetyn WT1-proteiinin tuotantoon. Tämä WT1:n osittainen toiminnan menetys liittyy sellaisten kasvainten kehittymiseen, joilla on stroomaalinen tai mesenkymaalinen fenotyyppi. Wilms3:n WT1-mutaatio ei kuitenkaan ole homotsygoottinen, mikä tekee sen tutkimisesta monimutkaisempaa, sillä siinä säilyy jonkin verran WT1:n toimintaa, joka voi vaikuttaa kasvaimen biologiaan eri tavalla verrattuna solulinjoihin, joissa WT1 menetetään kokonaan.

Wilms3:ssa on myös mutaatio CTNNB1-geenissä, joka vaikuttaa erityisesti treoniini 41:ään (p.T41A), jolla on kriittinen rooli Wnt-signalointireitillä. Tämä mutaatio stabiloi  $\beta$ -kateniinia, estää sen hajoamisen ja johtaa Wnt-reitin konstitutiiviseen aktivoitumiseen. Wnt-signalisaation jatkuva aktivoituminen edistää solujen lisääntymistä ja kasvainten syntyä Wilms3-taudissa, mikä tekee siitä keskeisen mallin CTNNB1-mutaatioiden vaikutusten tutkimiseen osittain toimivan WT1-taustan yhteydessä.

Fenotyyppisesti Wilms3-soluilla on mesenkymaalinen morfologia, joka ilmentää vimentiniä ja josta puuttuu sytokeratiini, mikä vastaa alkuperäisessä kasvaimessa havaittuja stroomaattisia ominaisuuksia. Näillä soluilla on rajallinen erilaistumispotentialiaali, ja ne pystyvät tietyissä olosuhteissa erilaistumaan jonkin verran mesenkymaalisesti. Wilms3:n proteomianalysit ovat paljastaneet useiden reseptorityrosiinikinaasien (RTK), kuten PDGFR $\beta$ :n ja AXL:n, aktivoituneen, mikä tukee solujen selviytymistä ja lisääntymistä. Lisäksi MAPK:n ja PI3K/AKT:n kaltaiset signaalireitit aktivoituvat, mikä vahvistaa Wilms3-solujen pahanlaatuisia ominaisuuksia.

Yksi Wilms3:n ainutlaatuinen piirre on sen osittainen WT1-toiminnallisuus, mikä tarjoaa erillisen näkökulman siihen, miten WT1-mutaatiot vaikuttavat Wilms-kaivaimen biologiaan, kun mutaatio ei ole täydellinen. WT1:n ja Wnt-signalisaation välinen vuorovaikutus Wilms3:ssa tarjoaa arvokkaan mahdollisuuden tutkia näiden reittien vivahteikkaita rooleja kasvainten kehityksessä. Kaiken kaikkiaan Wilms3 toimii tärkeänä mallina Wilmsin kasvaimen taustalla olevien molekyylimekanismien tutkimiseen osittaisen WT1-menetyksen ja konstitutiivisen Wnt-reitin aktivoitumisen yhteydessä.

**Organism** Ihminen

**Tissue** Munuaiset

**Disease** Wilmsin kasvain

**Applications** In vitro -soluviljelymalli. Biokemialliset tutkimukset

## Ominaisuudet

**Age** 11-12 kuukautta

**Gender** Mies

**Wilms3-solut | 300414****Ethnicity** Kaukasialainen**Morphology** Karanmuotoinen**Cell type** Wilmsin solut**Growth properties** Tarttuva**Säätelytiedot****Citation** Wilms3 (Cytionin luettelonumero 300414)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_A5SF**Biomolekyylitiedot****Mutational profile** WT1-mutaation status: homotsygoottinen c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1-mutaation status: villiintynyt**Käsittely****Culture Medium** MSCGM-pakkaus (Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

## Wilms3-solut | 300414

**Freeze medium**

Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

**Incubation Atmosphere**

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , kostutettu ilmakehä.

**Flask Coating**

Ei mitään

**Freezing Procedure**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

## Wilms3-solut | 300414

### Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädssä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

### Storage Conditions

Pitkäaikaisäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

## Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

### Sterility

Mykoplasmaakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.

### HLA-alleelit

**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