

**Komórki Wilms3 | 300414****Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa Wilms3 została utworzona z pierwotnego guza Wilmsa u pacjenta pediatrycznego, charakteryzującego się mutacją somatyczną WT1. W przeciwieństwie do wielu innych linii komórkowych guza Wilmsa, Wilms3 posiada heterozygotyczną mutację przesunięcia ramki w genie WT1 (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), prowadzącą do produkcji skróconego białka WT1. Ta częściowa utrata funkcji WT1 jest związana z rozwojem guzów, które wykazują fenotyp zrębu lub mezenchymalny. Jednak mutacja WT1 w Wilms3 nie jest homozygotyczna, co zwiększa złożoność jej badania, ponieważ zachowuje pewną funkcję WT1, która może wpływać na biologię guza inaczej niż linie komórkowe z całkowitą utratą WT1.

Wilms3 jest również nosicielem mutacji w genie CTNNB1, w szczególności wpływającej na treoninę 41 (p.T41A), która odgrywa kluczową rolę w szlaku sygnałowym Wnt. Mutacja ta stabilizuje  $\beta$ -kateninę, zapobiegając jej degradacji i prowadząc do konstytutywnej aktywacji szlaku Wnt. Utrzymująca się aktywacja sygnalizacji Wnt napędza proliferację komórek i przyczynia się do nowotworzenia w Wilms3, co czyni go kluczowym modelem do badania wpływu mutacji CTNNB1 w kontekście częściowo funkcjonalnego tła WT1.

Fenotypowo, komórki Wilms3 wykazują morfologię mezenchymalną, ekspresję wimentyny i brak cytokeratyny, co jest zgodne z cechami zrębu obserwowanymi w pierwotnym guzie. Komórki te wykazują ograniczony potencjał różnicowania, ze zdolnością do różnicowania mezenchymalnego w określonych warunkach. Analizy proteomiczne Wilms3 ujawniły aktywację kilku receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK), w tym PDGFR $\beta$  i AXL, które wspierają przeżycie i proliferację komórek. Dodatkowo, aktywowane są dalsze szlaki sygnałowe, takie jak MAPK i PI3K/AKT, wzmacniając złośliwe właściwości komórek Wilms3.

Unikalnym aspektem Wilms3 jest jego częściowa funkcjonalność WT1, co zapewnia odrębną perspektywę na to, w jaki sposób mutacje WT1 przyczyniają się do biologii guza Wilmsa, gdy mutacja nie jest kompletna. Wzajemne oddziaływanie między WT1 i sygnalizacją Wnt w Wilms3 oferuje cenną okazję do zbadania zniuansowanych ról, jakie te szlaki odgrywają w rozwoju nowotworu. Ogólnie rzecz biorąc, Wilms3 służy jako ważny model do badania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw guza Wilmsa w obecności częściowej utraty WT1 i konstytutywnej aktywacji szlaku Wnt.

**Organism** Człowiek**Tissue** Nerka**Disease** Guz Wilmsa**Applications** Model hodowli komórkowej in vitro. Badania biochemiczne**Charakterystyka****Age** 11-12 miesięcy**Gender** Mężczyzna**Ethnicity** Kaukaski

**Komórki Wilms3 | 300414****Morphology** Wrzecionowaty kształt**Cell type** Komórki Wilmsa**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** Wilms3 (numer katalogowy Cytion 300414)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_A5SF**Depositor** B. Royer-Pokora**Dane biomolekularne****Mutational profile** Status mutacji WT1: homozygotyczny c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, status mutacji CTNNB1: typ dziki**Obsługa****Culture Medium** Zestaw MSCGM (od Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

**Komórki Wilms3 | 300414****Freeze medium**

Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej  $-150^{\circ}\text{C}$ , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością  $300 \times g$  przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation Atmosphere**

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , nawilżona atmosfera.

**Flask Coating**

Brak

## Komórki Wilms3 | 300414

### Freezing Procedure

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

### Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

### Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

## Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

### Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczone przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

### Profil STR

**Amelogenin:** x,y  
**CSF1PO:** 11,12  
**D13S317:** 12,13  
**D16S539:** 9,11  
**D5S818:** 9,9  
**D7S820:** 10,11  
**TH01:** 6,6  
**TPOX:** 8,8  
**vWA:** 16,17  
**D3S1358:** 15,16  
**D21S11:** 29,31  
**D18S51:** 13,17  
**Penta E:** 7,10  
**Penta D:** 9,13  
**D8S1179:** 10,11  
**FGA:** 22,24

**Komórki Wilms3 | 300414**

**Allele HLA**

**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