

Celice Wilms3 | 300414**Splošne informacije****Description**

Celična linija Wilms3 je bila pridobljena iz primarnega Wilmsovega tumorja pri pediatričnem bolniku, za katerega je bila značilna somatska mutacija WT1. Za razliko od številnih drugih celičnih linij tumorjev Wilms ima Wilms3 heterozigotsko mutacijo premik okvirja v genu WT1 (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), zaradi česar nastaja skrajšana beljakovina WT1. Ta delna izguba funkcije WT1 je povezana z razvojem tumorjev, ki imajo stromalni ali mezenhimski fenotip. Vendar mutacija WT1 pri Wilms3 ni homozigotna, kar še dodatno zaplete njeno preučevanje, saj ohrani del funkcije WT1, ki lahko drugače vpliva na biologijo tumorja v primerjavi s celičnimi linijami s popolno izgubo WT1.

Wilms3 ima tudi mutacijo v genu CTNNB1, ki prizadene predvsem treonin 41 (p.T41A), ki ima ključno vlogo v signalni poti Wnt. Ta mutacija stabilizira β -katenin, kar preprečuje njegovo razgradnjo in vodi do konstitutivne aktivacije poti Wnt. Vztrajna aktivacija signalizacije Wnt spodbuja proliferacijo celic in prispeva k tumorogenezi pri Wilms3, zaradi česar je Wilms3 ključni model za preučevanje vpliva mutacij CTNNB1 v okviru delno funkcionalnega ozadja WT1.

Fenotipsko imajo celice Wilms3 mezenhimsko morfologijo, izražajo vimentin in nimajo citokeratina, kar ustreza stromalnim značilnostim, opaženim v prvotnem tumorju. Te celice imajo omejen diferencijski potencial, pod posebnimi pogoji pa so sposobne mezenhimske diferenciacije. Proteomske analize Wilms3 so razkrile aktivacijo več receptorskih tirozinskih kinaz (RTK), vključno s PDGFR β in AXL, ki podpirajo preživetje in proliferacijo celic. Poleg tega se aktivirajo signalne poti, kot sta MAPK in PI3K/AKT, kar krepi maligne lastnosti celic Wilms3.

Edinstven vidik Wilms3 je delna funkcionalnost WT1, kar omogoča poseben pogled na to, kako mutacije WT1 prispevajo k biologiji tumorjev Wilms, kadar mutacija ni popolna. Vzajemno delovanje med signalizacijo WT1 in Wnt v Wilms3 ponuja dragoceno priložnost za preučevanje raznolikih vlog, ki jih imata ti poti pri razvoju tumorjev. Na splošno je Wilms3 pomemben model za raziskovanje molekularnih mehanizmov, ki so podlaga za nastanek tumorja Wilms ob delni izgubi WT1 in konstitutivni aktivaciji poti Wnt.

Organism Človek**Tissue** Ledvice**Disease** Wilmsov tumor**Applications** In vitro model celične kulture. Biokemične študije**Značilnosti****Age** 11-12 mesecev**Gender** Moški**Ethnicity** Kavkaški**Morphology** Vretenasta oblika

Celice Wilms3 | 300414**Cell type** Wilmsove celice**Growth properties** Pripadajoče**Regulativni podatki****Citation** Wilms3 (kataloška številka Cytion 300414)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SF**Biomolekularni podatki****Mutational profile** Status mutacije WT1: homozigotna c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, status mutacije CTNNB1: divji tip**Ravnanje s spletno stranjo****Culture Medium** Komplet MSCGM (Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstranite staro gojišče z adherentnih celic in jih sperite s PBS, ki ne vsebuje kalcija in magnezija. Za bučke T25 uporabite 3-5 ml PBS, za bučke T75 pa 5-10 ml. Nato celice popolnoma prekrijte z Accutase, pri čemer uporabite 1-2 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75. Celice pustite inkubirati pri sobni temperaturi 8-10 minut, da se ločijo. Po inkubaciji celice nežno premešajte z 10 ml gojišča, da se ponovno suspendirajo, nato jih 3 minute centrifugirajte pri 300xg. Zavrzite supernatant, ponovno suspendirajte celice v svežem gojišču in jih prenesite v nove bučke, ki že vsebujejo sveže gojišče.**Freeze medium** Kot gojišče za kriokonzervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče (vključno s FBS) + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi ali CM-1 (kataloška številka 800100 podjetja Cytion), ki vključuje optimizirane osmoprotektante in presnovne stabilizatorje za izboljšanje okrevanja in zmanjšanje stresa, povzročene s kriom.

Celice Wilms3 | 300414

Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu kriovial takoj shranite pri temperaturi pod $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa kriovial razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri $300 \times g$ 3 minute, da ločite celice, in previdno zavržite supernatant, ki vsebuje ostanke zamrzovalnega gojišča.
7. Pelet celic nežno ponovno suspendirajte v 10 ml svežega gojišča. Pri adherentnih celicah suspenzijo razdelite med dve bučki T25; pri suspenzijskih kulturah prenesite vse gojišče v eno bučko T25, da spodbudite učinkovito interakcijo in rast celic.
8. Upoštevajte uveljavljene protokole subkultur za nadaljnjo rast in vzdrževanje celične linije ter tako zagotovite zanesljive rezultate poskusov.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažno ozračje.

Flask Coating

Nič

Freezing Procedure

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Shipping Conditions

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Celice Wilms3 | 300414

Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vial postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do -196 °C. Shranjevanje pri -80 °C je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA

Sterility

Kontaminacija z mikoplazmo se izključi z uporabo testov na podlagi PCR in metod za odkrivanje mikoplazme na podlagi luminiscence.

Da se zagotovi, da ni kontaminacije z bakterijami, glivami ali kvasovkami, se celične kulture dnevno vizualno pregledujejo.

Aleli 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