

Buňky Wilms3 | 300414

Obecné informace

Description

Buněčná linie Wilms3 byla vytvořena z primárního Wilmsova nádoru u dětského pacienta, který se vyznačoval somatickou mutací WT1. Na rozdíl od mnoha jiných buněčných linií Wilmsova nádoru je Wilms3 nositelem heterozygotní frameshift mutace v genu WT1 (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), která vede k produkci zkráceného proteinu WT1. Tato částečná ztráta funkce WT1 je spojena s rozvojem nádorů, které vykazují stromální nebo mezenchymální fenotyp. Mutace WT1 u Wilms3 však není homozygotní, což přispívá ke složitosti jejího studia, protože si zachovává určitou funkci WT1, která může ovlivňovat biologii nádoru odlišně ve srovnání s buněčnými liniemi s úplnou ztrátou WT1.

Wilms3 nese také mutaci v genu CTNNB1, konkrétně postihující threonin 41 (p.T41A), který hraje kritickou roli v signální dráze Wnt. Tato mutace stabilizuje β -katenin, čímž brání jeho degradaci a vede ke konstitutivní aktivaci dráhy Wnt. Přetrvávající aktivace signalizace Wnt pohání buněčnou proliferaci a přispívá k tumorigenezi u Wilms3, což z něj činí klíčový model pro studium dopadu mutací CTNNB1 v kontextu částečně funkčního pozadí WT1.

Fenotypově buňky Wilms3 vykazují morfologii podobnou mezenchymálnímu nádoru, exprimují vimentin a postrádají cytokeratin, což odpovídá stromálním charakteristikám pozorovaným v původním nádoru. Tyto buňky vykazují omezený diferenciační potenciál se schopností určité mezenchymální diferenciace za specifických podmínek. Proteomické analýzy Wilms3 odhalily aktivaci několika receptorových tyrozinkináz (RTK), včetně PDGFR β a AXL, které podporují přežití a proliferaci buněk. Kromě toho jsou aktivovány navazující signální dráhy, jako jsou MAPK a PI3K/AKT, což posiluje maligní vlastnosti buněk Wilms3.

Jedním z jedinečných aspektů Wilms3 je částečná funkčnost WT1, což poskytuje odlišný pohled na to, jak mutace WT1 přispívají k biologii Wilmsova nádoru, pokud mutace není úplná. Vzájemné působení signalizace WT1 a Wnt u Wilms3 nabízí cennou příležitost ke studiu diferencovaných rolí, které tyto dráhy hrají ve vývoji nádoru. Celkově Wilms3 slouží jako důležitý model pro zkoumání molekulárních mechanismů, které jsou základem Wilmsova nádoru v přítomnosti částečné ztráty WT1 a konstitutivní aktivace dráhy Wnt.

Organism Člověk

Tissue Ledviny

Disease Wilmsův nádor

Applications Model buněčné kultury in vitro. Biochemické studie

Charakteristika

Age 11-12 měsíců

Gender Muži

Ethnicity Kavkazský

Buňky Wilms3 | 300414**Morphology** Vřetenovitý tvar**Cell type** Wilmsovy buňky**Growth properties** Adherentní**Regulační údaje****Citation** Wilms3 (katalogové číslo Cytion 300414)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SF**Depositor** B. Royer-Pokora**Biomolekulární data****Mutational profile** Stav mutace WT1: homozygotní c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, stav mutace CTNNB1: divoký typ**Zpracování****Culture Medium** Souprava MSCGM (od společnosti Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčičku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.

Buňky Wilms3 | 300414**Freeze medium**

Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

Thawing and Culturing Cells

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředíte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělíte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žádný

Freezing Procedure

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Buňky Wilms3 | 300414**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

**Storage
Conditions**

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA**Sterility**

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuální kontrolám.

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

Alely 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