

Wilmsovy8 buňky | 300416

Obecné informace

Description

Buněčná linie Wilms8 byla odvozena z primárního Wilmsova nádoru u dětského pacienta se zárodečnou mutací WT1. Tato buněčná linie je charakterizována homozygotní nonsense mutací v genu WT1 (c.1168 C>T, p.R390X), která vede k úplné ztrátě funkce WT1. WT1 je klíčový pro normální vývoj ledvin a jeho inaktivace je běžným rysem u některých agresivních podtypů Wilmsova nádoru, zejména těch, které vykazují mezenchymální diferenciaci. Wilms8 proto představuje cenný model pro studium vlivu ztráty WT1 na tumorigenezi, zejména v kontextu Wilmsových nádorů, které vznikají s výraznou stromální složkou.

Kromě mutace WT1 nesou buňky Wilms8 mutaci v genu CTNNB1 (p.S45A), který kóduje β -katenin, klíčový regulátor signální dráhy Wnt. Mutace na serinu 45 narušuje normální proces fosforylace, který vede k degradaci β -Cateninu, a způsobuje jeho stabilizaci a akumulaci v jádře. To má za následek konstitutivní aktivaci signalizace Wnt, která pohání buněčnou proliferaci a přispívá k onkogenním vlastnostem buněčné linie Wilms8. Vzájemné působení mezi ztrátou WT1 a aberantní signalizací Wnt u Wilms8 z ní činí klíčový model pro pochopení molekulárních mechanismů, které jsou základem těchto drah v biologii nádorů Wilms.

Buňky Wilms8 vykazují mezenchymální fenotyp charakterizovaný expresí vimentinu a absencí epiteliálních markerů, jako je cytokeratin. To odpovídá stromální diferenciaci pozorované v původním nádoru. Buňky vykazují omezenou schopnost podstoupit další mezenchymální diferenciaci, například za specifických podmínek vytvářet buňky podobné svalům. Proteomické analýzy Wilmsova8 nádoru odhalily aktivaci mnoha receptorových tyrozinkináz (RTK), včetně PDGFR β a AXL, které se podílejí na klíčových procesech, jako je přežívání, migrace a proliferace buněk. K agresivním vlastnostem buněk Wilms8 dále přispívá aktivace navazujících signálních drah, zejména drah MAPK a PI3K/AKT.

Celkově lze říci, že buněčná linie Wilms8 slouží jako základní nástroj pro zkoumání molekulárního základu Wilmsova nádoru způsobeného ztrátou WT1 a aberantní signalizací Wnt. Její genetické a fenotypové vlastnosti z ní činí robustní platformu pro studium interakce mezi těmito kritickými drahami a pro identifikaci potenciálních terapeutických cílů u Wilmsových nádorů se stromální složkou.

Organism Člověk

Tissue Ledviny

Disease Wilmsův nádor

Applications Model buněčné kultury in vitro. Biochemické studie

Charakteristika

Age 8 měsíců

Gender Muži

Ethnicity Kavkazský

Wilmsovy8 buňky | 300416**Morphology** Vřetenovitý tvar**Cell type** Wilmsovy buňky**Growth properties** Adherentní**Regulační údaje****Citation** Wilms8 (katalogové číslo Cytion 300416)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SJ**Depositor** B. Royer-Pokora**Biomolekulární data****Mutational profile** Stav mutace WT1: homozygotní c.1168C>T, p.390x, LOH: , stav mutace CTNNB1: heterozygotní TCT>GCT, p.S45A**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.

Wilmsovy8 buňky | 300416**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 rozdělte 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.

Wilmsovy8 buňky | 300416**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: 8,9
D16S539: 13,13
D5S818: 12,13
D7S820: 8,10
TH01: 8,8
TPOX: 8,9
vWA: 18,18
D3S1358: 16,18
D21S11: 29,33.2
D18S51: 12,12
Penta E: 12,17
Penta D: 10,12
D8S1179: 8,13
FGA: 20,21

Alely HLA

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