

Wilms3-celler | 300414

Generel information

Description

Wilms3-cellelinjen blev etableret fra en primær Wilms-tumor hos en pædiatrisk patient, der var karakteriseret ved en somatisk WT1-mutation. I modsætning til mange andre Wilms-tumorcellelinjer har Wilms3 en heterozygot frameshift-mutation i WT1-genet (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), der fører til produktion af et afkortet WT1-protein. Dette delvise tab af WT1-funktion er forbundet med udviklingen af tumorer, der viser en stromal eller mesenkymal fænotype. WT1-mutationen i Wilms3 er dog ikke homozygot, hvilket gør undersøgelsen mere kompleks, da den bevarer en vis WT1-funktion, som kan påvirke tumorbiologien på en anden måde end cellelinjer med komplet WT1-tab.

Wilms3 bærer også en mutation i CTNNB1-genet, der specifikt påvirker treonin 41 (p.T41A), som spiller en kritisk rolle i Wnt-signalvejen. Denne mutation stabiliserer β -Catenin, forhindrer dets nedbrydning og fører til konstitutiv aktivering af Wnt-signalvejen. Den vedvarende aktivering af Wnt-signalering driver celleproliferation og bidrager til tumorigenese i Wilms3, hvilket gør den til en vigtig model til undersøgelse af effekten af CTNNB1-mutationer i sammenhæng med en delvist funktionel WT1-baggrund.

Fænotypisk udviser Wilms3-celler en mesenkymal lignende morfologi, der udtrykker vimentin og mangler cytokeratin, hvilket stemmer overens med de stromale egenskaber, der er observeret i den oprindelige tumor. Disse celler udviser et begrænset differentieringspotentiale med evnen til at undergå en vis mesenkymal differentiering under specifikke forhold. Proteomiske analyser af Wilms3 har afsløret aktivering af flere receptortyrosinkinaser (RTK'er), herunder PDGFR β og AXL, som understøtter celleoverlevelse og -spredning. Derudover aktiveres downstream-signalveje som MAPK og PI3K/AKT, hvilket forstærker Wilms3-cellernes ondartede egenskaber.

Et unikt aspekt ved Wilms3 er dens delvise WT1-funktionalitet, som giver et særskilt perspektiv på, hvordan WT1-mutationer bidrager til Wilms-tumorbiologi, når mutationen ikke er komplet. Samspillet mellem WT1 og Wnt-signalering i Wilms3 giver en værdifuld mulighed for at studere de nuancerede roller, som disse veje spiller i tumorudvikling. Samlet set fungerer Wilms3 som en vigtig model til undersøgelse af de molekylære mekanismer, der ligger til grund for Wilms-tumor i nærvær af delvist WT1-tab og konstitutiv Wnt-signalvejsaktivering.

Organism	Menneske
Tissue	Nyre
Disease	Wilms-tumor
Applications	In vitro-cellekulturmodel. Biokemiske undersøgelser

Karakteristika

Age	11-12 måneder
Gender	Mand

Wilms3-celler | 300414

Ethnicity	Kaukasisk
Morphology	Spindelformet
Cell type	Wilms-celler
Growth properties	Vedhæftende

Regulatoriske data

Citation	Wilms3 (Cytion katalognummer 300414)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_A5SF

Biomolekylære data

Mutational profile	WT1-mutationsstatus: homozygot c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1-mutationsstatus: vildtype
---------------------------	--

Håndtering

Culture Medium	MSCGM-kit (fra Lonza)
Dissociation Reagent	Accutase

Subculturing	Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspendere cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.
---------------------	--

Wilms3-celler | 300414**Freeze medium**

Som kryopræserveringsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobybeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

Thawing and Culturing Cells

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befugtet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Wilms3-celler | 300414

Shipping Conditions

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Kvalitetskontrol / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.

HLA-alleler

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