

Wilms8-celler | 300416

Generel information

Description

Wilms8-cellelinjen stammer fra en primær Wilms-tumor hos en pædiatrisk patient med en germline WT1-mutation. Denne cellelinje er karakteriseret ved en homozygot nonsensmutation i WT1-genet (c.1168 C>T, p.R390X), hvilket fører til et fuldstændigt tab af WT1-funktion. WT1 er afgørende for normal nyreudvikling, og dets inaktivering er et almindeligt træk i visse aggressive undertyper af Wilms-tumor, især dem, der udviser mesenkymal differentiering. Wilms8 er derfor en værdifuld model til at studere effekten af WT1-tab på tumorigenese, især i forbindelse med Wilms-tumorer, der opstår med en udpræget stromal komponent.

Ud over WT1-mutationen har Wilms8-celler en mutation i CTNNB1-genet (p.S45A), som koder for β -Catenin, en vigtig regulator af Wnt-signalvejen. Mutationen på serin 45 forstyrrer den normale fosforyleringsproces, der fører til nedbrydning af β -Catenin, hvilket forårsager stabilisering og ophobning i kernen. Dette resulterer i en konstitutiv aktivering af Wnt-signalering, som driver celleproliferation og bidrager til de onkogene egenskaber ved Wilms8-cellelinjen. Samspillet mellem WT1-tab og afvigende Wnt-signalering i Wilms8 gør den til en afgørende model for at forstå de molekylære mekanismer, der ligger til grund for disse veje i Wilms-tumorbiologi.

Wilms8-celler udviser en mesenkymfænotype, der er karakteriseret ved ekspresion af vimentin og fravær af epitelmarkører som cytokeratin. Dette stemmer overens med den stromale differentiering, der blev observeret i den oprindelige tumor. Cellerne udviser en begrænset evne til at gennemgå yderligere mesenkymal differentiering, såsom at danne muskellignende celler under specifikke forhold. Proteomiske analyser af Wilms8 har afsløret aktivering af flere receptortyrosinkinaser (RTK'er), herunder PDGFR β og AXL, som er involveret i nøgleprocesser som celleoverlevelse, migration og spredning. Aktiveringen af downstream-signalveje, især MAPK- og PI3K/AKT-vejene, bidrager yderligere til Wilms8-cellernes aggressive egenskaber.

Samlet set fungerer Wilms8-cellelinjen som et vigtigt værktøj til at undersøge det molekylære grundlag for Wilms-tumor, der er drevet af WT1-tab og afvigende Wnt-signalering. Dens genetiske og fænotypiske egenskaber gør den til en robust platform til at studere samspillet mellem disse kritiske veje og til at identificere potentielle terapeutiske mål i Wilms-tumorer med en stromal komponent.

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

Karakteristika

Age	8 måneder
Gender	Mand
Ethnicity	Kaukasisk

Wilms8-celler | 300416**Morphology** Spindelformet**Cell type** Wilms-celler**Growth properties** Vedhæftende**Regulatoriske data****Citation** Wilms8 (Cytion katalognummer 300416)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SJ**Biomolekylære data****Mutational profile** WT1-mutationsstatus: homozygot c.1168C>T, p.390x, LOH: , CTNNB1-mutationsstatus: heterozygot TCT>GCT, p.S45A**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.**Freeze medium** Som kryopræservationsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryoinduceret stress.

Wilms8-celler | 300416

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.

Shipping Conditions

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.

Wilms8-celler | 300416

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*: '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