

Wilms3 rakud | 300414

Üldine teave

Description

Wilms3 rakuliin loodi pediaatrilise patsiendi primaarsest Wilmsi kasvajast, mida iseloomustab somaatiline WT1-mutatsioon. Erinevalt paljudest teistest Wilmsi tuumori rakuliinidest on Wilms3-l heterosügootne frameshift-mutatsioon WT1 geenis (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), mis põhjustab kärbitud WT1 valgu tootmist. See WT1 funktsiooni osaline kadumine on seotud stromaalse või mesenhüümse fenotüübiga kasvajate tekkega. Wilms3 puhul ei ole WT1 mutatsioon siiski homosügootne, mis muudab selle uurimise keerulisemaks, kuna see säilitab osa WT1 funktsioonist, mis võib mõjutada kasvaja bioloogiat erinevalt võrreldes rakuliinidega, kus WT1 on täielikult kadunud.

Wilms3 kannab ka mutatsiooni CTNNB1 geenis, mis mõjutab konkreetselt 41. treoniini (p.T41A), mis mängib kriitilist rolli Wnt-signaaliteedis. See mutatsioon stabiliseerib β -kateniini, takistades selle lagunemist ja põhjustades Wnt-tee konstitutiivset aktiveerimist. Wnt-signalisatsiooni püsiv aktiveerimine põhjustab rakkude proliferatsiooni ja aitab kaasa Wilms3 kasvajate tekkimisele, mistõttu on see peamine mudel CTNNB1-mutatsioonide mõju uurimiseks osaliselt toimiva WT1-fooni kontekstis.

Fenotüübiliselt on Wilms3 rakkudel mesenhüümilaadne morfoloogia, mis ekspresseerib vimentini ja millel puudub tsütokeratiin, mis on kooskõlas algse kasvajas täheldatud stroomi omadustega. Nende rakkude diferentseerumispotentsiaal on piiratud, kusjuures nad suudavad teatud tingimustel diferentseeruda mesenhüümseks. Wilms3 proteoomilised analüüsid on näidanud mitmete retseptori türosiini kinaaside (RTK), sealhulgas PDGFR β ja AXL aktiveerimist, mis toetavad rakkude ellujäämist ja proliferatsiooni. Lisaks on aktiveeritud sellised allavoolu signaalirajad nagu MAPK ja PI3K/AKT, mis tugevdavad Wilms3 rakkude pahaloomulisi omadusi.

Üks ainulaadne aspekt Wilms3 puhul on selle osaline WT1 funktsionaalsus, mis annab erilise perspektiivi, kuidas WT1 mutatsioonid aitavad kaasa Wilmsi kasvaja bioloogiale, kui mutatsioon ei ole täielik. WT1 ja Wnt-signalisatsiooni koostoime Wilms3-s annab väärtusliku võimaluse uurida nende radade nüansirikkaid rolle kasvaja arengus. Üldiselt on Wilms3 oluline mudel Wilmsi kasvaja aluseks olevate molekulaarsete mehhanismide uurimiseks osalise WT1 kao ja konstitutiivse Wnt-tee aktiveerimise korral.

Organism Inimene

Tissue Neerud

Disease Wilmsi kasvaja

Applications In vitro rakukultuuri mudel. Biokeemilised uuringud

Omadused

Age 11-12 kuud

Gender Mees

Ethnicity Kaukaasia

Wilms3 rakud | 300414**Morphology** Spindlikujuline**Cell type** Wilmsi rakud**Growth properties** Kinnipeetav**Regulatiivsed andmed****Citation** Wilms3 (Cytioni katalooginumber 300414)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SF**Biomolekulaarsed andmed****Mutational profile** WT1 mutatsiooni staatus: homosügootne c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1 mutatsiooni staatus: metsikut tüüpi**Töötlemine****Culture Medium** MSCGM komplekt (Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Eemaldage kleepunud rakkudelt vana söötmega ja peske need PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et need resuspenseerida, seejärel tsentrifugeerige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.**Freeze medium** Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

Wilms3 rakud | 300414

Thawing and Culturing Cells

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu $300 \times g$ juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Puudub

Freezing Procedure

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Shipping Conditions

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Wilms3 rakud | 300414

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.

HLA alleles

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