

Wilms8 rakud | 300416

Üldine teave

Description

Wilms8 rakuliin on saadud Wilmsi primaarsest Wilmsi kasvajast, mis pärineb WT1 mutatsiooniga pediaatrilisest patsiendist. Seda rakuliini iseloomustab homosügootne nonsense-mutatsioon WT1 geenis (c.1168 C>T, p.R390X), mis põhjustab WT1 funktsiooni täieliku kadumise. WT1 on neerude normaalseks arenguks hädavajalik ja selle inaktiveerimine on levinud Wilmsi kasvaja teatud agressiivsete alatüüpide puhul, eriti nende puhul, millel on mesenhüümiline diferentseerumine. Wilms8 on seega väärtuslik mudel WT1 kaotuse mõju uurimiseks kasvajate tekkimisele, eriti selliste Wilmsi kasvajate puhul, mis tekivad tugeva stromaalse komponendiga.

Lisaks WT1 mutatsioonile on Wilms8 rakkudes mutatsioon CTNNB1 geenis (p.S45A), mis kodeerib β -kateniini, mis on Wnt-signaaltee peamine regulaator. Mutatsioon seriini 45 juures häirib normaalset fosforüleerimisprotsessi, mis viib β -kateniini lagunemiseni, põhjustades selle stabiliseerumist ja akumulereerumist tuumas. Selle tulemuseks on Wnt-signalisatsiooni konstitutiivne aktiveerimine, mis juhib rakkude proliferatsiooni ja aitab kaasa Wilms8 rakuliini onkogeensetele omadustele. WT1 kaotuse ja Wnt-signalisatsiooni hälbimise vastastikune mõju Wilms8-s muudab selle oluliseks mudeliks, et mõista nende radade aluseks olevaid molekulaarseid mehhanisme Wilmsi kasvajate bioloogias.

Wilms8 rakkudel on mesenhüümiline fenotüüp, mida iseloomustab vimentiini ekspressioon ja epiteeli markerite, näiteks tsütokeratiini puudumine. See on kooskõlas algses kasvajas täheldatud stromaalse diferentseerumisega. Need rakud näitavad piiratud võimet edasiseks mesenhüümiliseks diferentseerumiseks, nagu näiteks lihasarnaste rakkude moodustamine spetsiifilistes tingimustes. Wilms8 proteoomilised analüüsid on näidanud mitmete retseptori türosiini kinaaside (RTK), sealhulgas PDGFR β ja AXL aktiveerimist, mis on seotud selliste oluliste protsessidega nagu rakkude ellujäämine, migratsioon ja proliferatsioon. Wilms8 rakkude agressiivsetele omadustele aitab lisaks kaasa allavoolu signaaliradade, eelkõige MAPK ja PI3K/AKT radade aktiveerimine.

Kokkuvõttes on Wilms8 rakuliin oluline vahend Wilmsi tuumori molekulaarse aluse uurimiseks, mis on tingitud WT1 kaotusest ja Wnt-signalisatsiooni kõrvalekaldumisest. Selle geneetilised ja fenotüüpilised omadused teevad sellest tugeva platvormi nende kriitiliste radade vahelise koostoime uurimiseks ja võimalike terapeutiliste sihtmärkide tuvastamiseks Wilmsi kasvajate puhul, millel on stromaalne komponent.

Organism Inimene

Tissue Neerud

Disease Wilmsi kasvaja

Applications In vitro rakukultuuri mudel. Biokeemilised uuringud

Omadused

Age 8 kuud

Gender Mees

Wilms8 rakud | 300416

Ethnicity	Kaukaasia
Morphology	Spindlikujuline
Cell type	Wilmsi rakud
Growth properties	Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation	Wilms8 (Cytioni katalooginumbr 300416)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_A5SJ

Biomolekulaarsed andmed

Mutational profile	WT1 mutatsiooni staatus: homosügootne c.1168C>T, p.390x, LOH: , CTNNB1 mutatsiooni staatus: heterosügootne TCT>GCT, p.S45A
---------------------------	--

Töötlemine

Culture Medium	MSCGM komplekt (Lonza)
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Eemaldage kleepunud rakkudel vana söötme ja peske neid 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 neid resuspenseerida, seejärel tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.
Freeze medium	Krüsäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumbr 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

Wilms8 rakud | 300416**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.

Wilms8 rakud | 300416

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*: '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