

Wilms3 Cellen | 300414

Algemene informatie

Description

De Wilms3-celijn is ontstaan uit een primaire Wilms-tumor van een pediatrische patiënt, gekenmerkt door een somatische WT1-mutatie. In tegenstelling tot veel andere Wilms-tumorcellijnen heeft Wilms3 een heterozygote frameshiftmutatie in het WT1-gen (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), wat leidt tot de productie van een afgekapt WT1-eiwit. Dit gedeeltelijke verlies van de WT1-functie wordt geassocieerd met de ontwikkeling van tumoren met een stromaal of mesenchymaal fenotype. De WT1-mutatie in Wilms3 is echter niet homozygoot, wat het onderzoek complexer maakt, omdat het enige WT1-functie behoudt die de tumorbiologie anders kan beïnvloeden dan cellijnen met volledig WT1-verlies.

Wilms3 draagt ook een mutatie in het CTNNB1-gen, specifiek van invloed op threonine 41 (p.T41A), dat een cruciale rol speelt in de Wnt-signaleringsroute. Deze mutatie stabiliseert β -Catenine, waardoor afbraak wordt voorkomen en de Wnt signaalroute constitutief wordt geactiveerd. De aanhoudende activering van Wnt-signalering stimuleert celproliferatie en draagt bij aan tumorigenese in Wilms3, waardoor het een belangrijk model is voor het bestuderen van de invloed van CTNNB1-mutaties in de context van een gedeeltelijk functionele WT1-achtergrond.

Fenotypisch vertonen Wilms3-cellen een mesenchym-achtige morfologie, waarbij vimentine tot expressie komt en cytokeratine ontbreekt, wat consistent is met de stromale kenmerken die in de oorspronkelijke tumor zijn waargenomen. Deze cellen vertonen een beperkt differentiatiepotentieel, met de mogelijkheid om onder specifieke omstandigheden enige mesenchymale differentiatie te ondergaan. Proteomische analyses van Wilms3 hebben de activering van verschillende receptor tyrosine kinases (RTK's) aangetoond, waaronder PDGFR β en AXL, die de overleving en proliferatie van de cellen ondersteunen. Daarnaast worden downstream signaalroutes zoals MAPK en PI3K/AKT geactiveerd, wat de kwaadaardige eigenschappen van Wilms3 cellen versterkt.

Een uniek aspect van Wilms3 is de gedeeltelijke WT1-functionaliteit, wat een ander perspectief biedt op hoe WT1-mutaties bijdragen aan de biologie van Wilms-tumoren wanneer de mutatie niet volledig is. De wisselwerking tussen WT1 en Wnt signalering in Wilms3 biedt een waardevolle mogelijkheid om de genuanceerde rol van deze pathways in de ontwikkeling van tumoren te bestuderen. Over het geheel genomen dient Wilms3 als een belangrijk model voor het onderzoeken van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan Wilms tumor in aanwezigheid van gedeeltelijk WT1 verlies en constitutieve Wnt pathway activatie.

Organism

Mens

Tissue

Nieren

Disease

Wilms tumor

Applications

In vitro celkweekmodel. Biochemische onderzoeken

Kenmerken

Age

11-12 maanden

Wilms3 Cellen | 300414**Gender** Mannelijk**Ethnicity** Kaukasisch**Morphology** Spilvormig**Cell type** Wilms cellen**Growth properties** Aanhangend**Regelgevende gegevens****Citation** Wilms3 (Cytion catalogusnummer 300414)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SF**Depositor** B. Royer-Pokora**Biomoleculaire gegevens****Mutational profile** WT1 mutatiestatus: homozygoot c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1 mutatiestatus: wild type**Omgaan met****Culture Medium** MSCGM-kit (van Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenden en vervolgens centrifugerend bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

Wilms3 Cellen | 300414

Freeze medium

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimeidium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij $300 \times g$ om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Flask Coating

Geen

Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Wilms3 Cellen | 300414

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.

STR profiel

Amelogenin: x,y
CSF1PO: 11,12
D13S317: 12,13
D16S539: 9,11
D5S818: 9,9
D7S820: 10,11
TH01: 6,6
TPOX: 8,8
vWA: 16,17
D3S1358: 15,16
D21S11: 29,31
D18S51: 13,17
Penta E: 7,10
Penta D: 9,13
D8S1179: 10,11
FGA: 22,24

HLA-allelen

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