

Wilms3-celler | 300414

Generell informasjon

Description

Wilms3-cellelinjen ble etablert fra en primær Wilms-svulst hos en pediatrik pasient, karakterisert av en somatisk WT1-mutasjon. I motsetning til mange andre Wilms-svulstcellelinjer har Wilms3 en heterozygot rammeskiftmutasjon i WT1-genet (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), noe som fører til produksjon av et avkortet WT1-protein. Dette delvise tapet av WT1-funksjonen er forbundet med utvikling av svulster som viser en stromal eller mesenkymal fenotype. WT1-mutasjonen i Wilms3 er imidlertid ikke homozygot, noe som gjør studien mer kompleks, ettersom den beholder en viss WT1-funksjon som kan påvirke tumorbiologien på en annen måte enn cellelinjer med fullstendig WT1-tap.

Wilms3 har også en mutasjon i CTNNB1-genet, som spesifikt påvirker treonin 41 (p.T41A), som spiller en kritisk rolle i Wnt-signalveien. Denne mutasjonen stabiliserer β -Catenin, forhindrer nedbrytning og fører til en konstitutiv aktivering av Wnt-signalveien. Den vedvarende aktiveringen av Wnt-signalering driver celleproliferasjon og bidrar til tumorutvikling i Wilms3, noe som gjør den til en viktig modell for å studere effekten av CTNNB1-mutasjoner i sammenheng med en delvis funksjonell WT1-bakgrunn.

Fenotypisk har Wilms3-cellene en mesenkymal lignende morfologi, uttrykker vimentin og mangler cytokeratin, noe som samsvarer med de stromale egenskapene som er observert i den opprinnelige svulsten. Disse cellene viser begrenset differensieringspotensial, med evne til å gjennomgå en viss mesenkymal differensiering under spesifikke forhold. Proteomanalyser av Wilms3 har avdekket aktivering av flere reseptortyrosinkinaser (RTK-er), blant annet PDGFR β og AXL, som bidrar til celleoverlevelse og -proliferasjon. I tillegg aktiveres nedstrøms signalveier som MAPK og PI3K/AKT, noe som forsterker Wilms3-cellenes ondartede egenskaper.

Et unikt aspekt ved Wilms3 er den delvise WT1-funksjonaliteten, noe som gir et nytt perspektiv på hvordan WT1-mutasjoner bidrar til Wilms-svulstens biologi når mutasjonen ikke er fullstendig. Samspillet mellom WT1- og Wnt-signalering i Wilms3 gir en verdifull mulighet til å studere de nyanserte rollene disse signalveiene spiller i tumorutvikling. Wilms3 er en viktig modell for å undersøke de molekylære mekanismene som ligger til grunn for Wilms-svulster ved delvis tap av WT1 og konstitutiv aktivering av Wnt-signalveier.

Organism Menneskelig

Tissue Nyre

Disease Wilms-svulst

Applications In vitro-cellekulturmodell. Biokjemiske studier

Kjennetegn

Age 11-12 måneder

Gender Mann

Ethnicity Kaukasisk

Wilms3-celler | 300414**Morphology** Spindelformet**Cell type** Wilms-celler**Growth properties** Vedhengende**Regulatoriske data****Citation** Wilms3 (Cytion katalognummer 300414)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SF**Depositor** B. Royer-Pokora**Biomolekylære data****Mutational profile** WT1-mutasjonsstatus: homozygot c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1-mutasjonsstatus: villtype**Håndtering****Culture Medium** MSCGM-sett (fra Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Fjern det gamle mediet fra de adherente cellene, og vask dem med PBS uten kalsium og magnesium. Bruk 3-5 ml PBS for T25-kolber og 5-10 ml for T75-kolber. Dekk deretter cellene helt med Accutase, med 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber. La cellene inkubere i romtemperatur i 8-10 minutter for å løsne dem. Etter inkubasjon blandes cellene forsiktig med 10 ml medium for å resuspendere dem, og sentrifuger deretter ved 300xg i 3 minutter. Kast supernatanten, resuspendere cellene i nytt medium, og overfør dem til nye kolber som allerede inneholder nytt medium.**Freeze medium** Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter optiming, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobeskyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoinduisert stress.

Wilms3-celler | 300414

Thawing and Culturing Cells

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrost ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkningsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspender cellepelletten forsiktig i 10 ml nytt dyrkningsmedium. For adherente celler, del suspensjonen mellom to T25-kulturkolber; for suspensjonskulturer, overfør alt mediet til én T25-kolbe for å fremme effektiv celleinteraksjon og vekst.
8. Følg etablerte subkulturprotokoller for fortsatt vekst og vedlikehold av cellelinjen, noe som sikrer pålitelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere

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

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

Shipping Conditions

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

Wilms3-celler | 300414

Storage Conditions

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.

For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.

STR-profil

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-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