

imWilms1 Celler | 300412

Generell informasjon

Description

Wilms1-cellelinjen ble opprinnelig avledet fra en primær Wilms-svulst fra en pasient som ble diagnostisert med store bilaterale nyresvulster, en karakteristisk presentasjon av Wilms-svulst (nefroblastom). Denne cellelinjen har en homozygot nonsensmutasjon i WT1-genet (c.149 C>A, p.S50X), noe som fører til produksjon av et avkortet, ikke-funksjonelt WT1-protein. WT1 er et kritisk gen i nyreutviklingen, og mutasjonen er nært forbundet med patogenesen av Wilms-svulster, særlig i svulster som viser stromal differensiering. Wilms1-celler har en stabil karyotype uten signifikante kromosomavvik, og de er karakterisert av en mesenkymal fenotype som uttrykker vimentin, men mangler epitelmarkører som cytokeratin. Linjen har en begrenset, men betydelig kapasitet for mesenkymal differensiering, inkludert potensialet for å differensiere til muskellignende celler under spesifikke forhold, noe som gjør den til en viktig modell for å studere de molekylære konsekvensene av WT1-mutasjoner.

For å overvinne den begrensede levetiden til de primære Wilms1-cellene ble imWilms1-cellelinjen etablert ved å introdusere en trippelmutant av SV40 large T-antigenet (U19dl89-97tsA58) i de opprinnelige tumorcellene, noe som muliggjør udødeliggjøring av disse. Denne modifikasjonen gjør at imWilms1-cellene kan formere seg på ubestemt tid, samtidig som kromosomstabiliteten opprettholdes, noe som gir en pålitelig modell for langtidstudier. De udødelige imWilms1-cellene har fortsatt den samme WT1-mutasjonen og beholder de mesenkymale egenskapene til den opprinnelige Wilms1-linjen.

I tillegg til de genetiske og fenotypiske egenskapene har imWilms1-cellelinjen blitt grundig analysert med tanke på signalveisaktivitet. Proteomstudier har avdekket fosforylering og aktivering av flere reseptortyrosinkinaser (RTK-er), inkludert EGFR, PDGFR β og AXL, med nedstrøms aktivering av MAPK-signalveiene. Den konsekvente aktiveringen av disse signalveiene i imWilms1-celler understreker deres relevans for utforskning av målrettede terapeutiske strategier i Wilms-svulster. Alt i alt fungerer imWilms1 som en robust og langsiktig modell for å undersøke de molekylære mekanismene som ligger til grunn for utvikling og progresjon av Wilms-svulster, spesielt de som er drevet av WT1-mutasjoner og avvikende signalveier.

Organism Menneskelig

Tissue Nyre

Disease Wilms-svulst

Synonyms IM-WT-1

Kjennetegn

Age 10 måneder

Gender Kvinne

Ethnicity Kaukasisk

imWilms1 Celler | 300412**Morphology** Spindelformet**Cell type** Wilms-celler**Growth properties** Vedhengende**Regulatoriske data****Citation** imWilms1 (Cytion-katalognummer 300412)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SN**Depositor** B. Royer-Pokora**GMO Status** GMO-S1: Denne imWilms1 humane Wilms-tumorlinjen inneholder en trippelmutant SV40 T-antigenkassett som muliggjør betinget udødeliggjøring for forskning på nefroblastom. Denne klassifiseringen gjelder bare i Tyskland og kan variere andre steder.**Biomolekylære data****Mutational profile** WT1-mutasjonsstatus: homozygot c. 149 C>A, p.S50x, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1-mutasjonsstatus: heterozygot TCT>TTT, p.S45F**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.

imWilms1 Celler | 300412

Fluid renewal 1 til 2 ganger per uke

Freeze medium

Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter opptining, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobeskyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoindusert stress.

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 dyrkingsmedium, 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

For optimal feste og levedyktighet etter tining anbefaler vi å bruke **kollagenbelagte kolber eller plater**.

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.

imWilms1 Celler | 300412**Shipping
Conditions**

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

**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,x
CSF1PO: 10,12
D13S317: 11,13
D16S539: 11,14
D5S818: 12,13,14
D7S820: 9,14
TH01: 9.3
TPOX: 8,9
vWA: 14,19
D3S1358: 14,17,18
D21S11: 30,31
D18S51: 15,18
Penta E: 5,14
Penta D: 13
D8S1179: 12,14
FGA: 22,25

HLA-alleler

A*: '03:01:01, '24:02:01
B*: '35:03:01, '38:01:01
C*: '12:03:01
DRB1*: '07:01:01, '14:54:01
DQA1*: '01:04:01, '02:01:01
DQB1*: '02:02:01, '05:03:01
DPB1*: '02:01:02G, '04:02:01G
E: '01:03:01, '01:03:02