

Wilms8-celler | 300416

Generell informasjon

Description

Wilms8-cellelinjen ble avledet fra en primær Wilms-svulst hos en pediatrik pasient med en WT1-mutasjon i kimbanen. Denne cellelinjen er karakterisert av en homozygot nonsensmutasjon i WT1-genet (c.1168 C>T, p.R390X), noe som fører til et fullstendig tap av WT1-funksjon. WT1 er avgjørende for normal nyreutvikling, og inaktivering av WT1 er et vanlig trekk ved visse aggressive undertyper av Wilms-svulster, særlig de som viser mesenkymal differensiering. Wilms8 er derfor en verdifull modell for å studere effekten av WT1-tap på tumorigenese, spesielt i forbindelse med Wilms-svulster som oppstår med en utpreget stromal komponent.

I tillegg til WT1-mutasjonen har Wilms8-celler en mutasjon i CTNNB1-genet (p.S45A), som koder for β -katenin, en viktig regulator av Wnt-signalveien. Mutasjonen på serin 45 forstyrrer den normale fosforyleringsprosessen som fører til nedbrytning av β -Catenin, noe som fører til at β -Catenin stabiliseres og akkumuleres i kjernen. Dette resulterer i en konstitutiv aktivering av Wnt-signalering, noe som driver celleproliferasjon og bidrar til de onkogene egenskapene til Wilms8-cellelinjen. Samspillet mellom tap av WT1 og avvikende Wnt-signalering i Wilms8 gjør denne cellelinjen til en viktig modell for å forstå de molekylære mekanismene som ligger til grunn for disse signalveiene i Wilms' tumorbiologi.

Wilms8-celler viser en mesenkymal fenotype, karakterisert ved uttrykk av vimentin og fravær av epitelmarkører som cytokeratin. Dette samsvarer med den stromale differensieringen som ble observert i den opprinnelige svulsten. Cellene viser en begrenset evne til å gjennomgå ytterligere mesenkymal differensiering, for eksempel til å danne muskellignende celler under spesifikke betingelser. Proteomanalyser av Wilms8 har avdekket aktivering av flere reseptortyrosinkinaser (RTK-er), blant annet PDGFR β og AXL, som er involvert i viktige prosesser som celleoverlevelse, migrasjon og proliferasjon. Aktiveringen av nedstrøms signalveier, særlig MAPK- og PI3K/AKT-veiene, bidrar ytterligere til Wilms8-cellenes aggressive egenskaper.

Wilms8-cellelinjen er et viktig verktøy for å undersøke det molekylære grunnlaget for Wilms-svulster som skyldes tap av WT1 og avvikende Wnt-signalering. Cellelinjens genetiske og fenotypiske egenskaper gjør den til en robust plattform for å studere samspillet mellom disse kritiske signalveiene og for å identifisere potensielle terapeutiske mål i Wilms-svulster med en stromal komponent.

Organism Menneskelig

Tissue Nyre

Disease Wilms-svulst

Applications In vitro-cellekulturmodell. Biokjemiske studier

Kjennetegn

Age 8 måneder

Gender Mann

Ethnicity Kaukasisk

Wilms8-celler | 300416**Morphology** Spindelformet**Cell type** Wilms-celler**Growth properties** Vedhengende**Regulatoriske data****Citation** Wilms8 (Cytion katalognummer 300416)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SJ**Depositor** B. Royer-Pokora**Biomolekylære data****Mutational profile** WT1-mutasjonsstatus: homozygot c.1168C>T, p.390x, LOH: , CTNNB1-mutasjonsstatus: heterozygot TCT>GCT, p.S45A**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.

Wilms8-celler | 300416

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 cellepelleten forsiktig i 10 ml nytt dyrkingsmedium. 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.

Wilms8-celler | 300416

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: 8,9
D16S539: 13,13
D5S818: 12,13
D7S820: 8,10
TH01: 8,8
TPOX: 8,9
vWA: 18,18
D3S1358: 16,18
D21S11: 29,33.2
D18S51: 12,12
Penta E: 12,17
Penta D: 10,12
D8S1179: 8,13
FGA: 20,21

HLA-alleler

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