

Komórki Wilmsa6 | 300415**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa Wilms6 została utworzona z pierwotnego guza Wilmsa u pacjenta pediatrycznego z mutacją germinálną WT1. Ta linia komórkowa jest zdefiniowana przez homozygotyczną mutację nonsensowną w genie WT1 (c.1168 C>T, p.R390X), która skutkuje skróconym i niefunkcjonalnym białkiem WT1. WT1 jest krytycznym regulatorem rozwoju nerek, a jego utrata jest silnie związana z guzem Wilmsa, szczególnie w przypadkach wykazujących różnicowanie mezenchymalne. Linia komórkowa Wilms6 jest ważnym modelem do badania nowotworowych skutków całkowitej utraty WT1, szczególnie w kontekście guzów, które wykazują zarówno cechy nabłonkowe, jak i mezenchymalne.

Komórki Wilms6 są również nosicielami mutacji w genie CTNNB1, w szczególności wpływającej na serynę 45 (p.S45F), kluczowe miejsce fosforylacji, które reguluje degradację β -kateniny. Mutacja ta prowadzi do stabilizacji i akumulacji jądrowej β -kateniny, co skutkuje konstytutywną aktywacją szlaku sygnałowego Wnt. Nieprawidłowa aktywacja sygnalizacji Wnt jest znanym czynnikiem napędzającym proliferację komórek i nowotworzenie w guzach Wilmsa, dzięki czemu Wilms6 jest cennym narzędziem do badania roli dysregulacji szlaku Wnt w guzach z mutacją WT1.

Fenotypowo, komórki Wilms6 wykazują morfologię mezenchymálną, z silną ekspresją wimentyny i brakiem markerów nabłonkowych, takich jak cytokeratyna, co odzwierciedla zrębową naturę pierwotnego guza. Wykazano, że komórki te mają ograniczony, ale znaczący potencjał różnicowania, w tym zdolność do różnicowania się w komórki mięśniopodobne w określonych warunkach, co odzwierciedla różnicowanie mezenchymalne obserwowane w niektórych guzach Wilmsa. Badania proteomiczne guzów Wilmsa6 zidentyfikowały aktywację wielu receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK), w tym PDGFR β i AXL, które są zaangażowane w promowanie przeżycia, proliferacji i migracji komórek. Aktywacja szlaków sygnałowych, takich jak MAPK i PI3K/AKT, dodatkowo podkreśla agresywny charakter tej linii komórkowej.

Ogólnie rzecz biorąc, linia komórkowa Wilms6 służy jako kluczowy model do badania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw rozwoju guza Wilmsa, szczególnie w przypadkach całkowitej utraty WT1 w połączeniu z aktywacją sygnalizacji Wnt. Jego cechy genetyczne i fenotypowe sprawiają, że jest to doskonała platforma do badania interakcji między niedoborem WT1 a nieprawidłowymi szlakami sygnalizacyjnymi, zapewniając wgląd w potencjalne cele terapeutyczne dla tego agresywnego typu nowotworu.

Organism Człowiek**Tissue** Nerka**Disease** Guz Wilmsa**Applications** Model hodowli komórkowej in vitro. Badania biochemiczne**Charakterystyka****Age** 15 miesięcy**Gender** Mężczyzna

Komórki Wilmsa6 | 300415**Ethnicity** Kaukaski**Morphology** Wrzecionowaty kształt**Cell type** Komórki Wilmsa**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** Wilms6 (numer katalogowy Cytion 300415)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SI**Depositor** B. Royer-Pokora**Dane biomolekularne****Mutational profile** Status mutacji WT1: homozygotyczny c.1168C>T, p.R390x, LOH: 11p11-11pter, status mutacji CTNNB1: homozygotyczny del TCT, p.DS45**Obsługa****Culture Medium** Zestaw MSCGM (od Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Komórki Wilmsa6 | 300415**Freeze medium**

Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Thawing and Culturing Cells

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml próbówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

Komórki Wilmsa6 | 300415**Freezing Procedure**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA**Sterility**

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczone przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

Profil STR

Amelogenin: x,y
CSF1PO: 11,12
D13S317: 8,11
D16S539: 9,11
D5S818: 8,9
D7S820: 8,11
TH01: 9,9
TPOX: 11,11
vWA: 16,18
D3S1358: 15,16
D21S11: 28,30
D18S51: 12,16
Penta E: 8,13
Penta D: 11,11
D8S1179: 11,13
FGA: 22,23

Komórki Wilmsa6 | 300415

Allele HLA

A*: '02:05:01, '29:01:01

B*: '07:05:01, '13:02:01

C*: '06:02:01, '15:05:02

DRB1*: '07:01:01, '10:01:01

DQA1*: '01:05:01, '02:01:01

DQB1*: '02:02:01, '05:01:01

DPB1*: '04:02:01, '17:01:01

E: '01:01:01