

Komórki Wilmsa2 | 300413**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa Wilms2 została uzyskana z pierwotnego guza Wilmsa u pacjenta pediatrycznego z mutacją germinálną WT1. Ta linia komórkowa charakteryzuje się homozygotyczną mutacją nonsensowną w genie WT1 (c.1084 C>T, p.R362X), która powoduje produkcję skróconego, niefunkcjonalnego białka WT1. Utrata funkcjonalnego WT1, genu niezbędnego do rozwoju nerek, jest cechą charakterystyczną niektórych podtypów guza Wilmsa, szczególnie tych związanych z różnicowaniem mezenchymalnym lub zrębowym. Linia komórkowa Wilms2 jest ważnym modelem do badania procesów nowotworowych napędzanych utratą WT1, szczególnie w kontekście guzów Wilmsa, które zachowują inne krytyczne cechy genetyczne.

Komórki Wilms2 są również nosicielami mutacji w genie CTNNB1, który koduje β -kateninę, kluczowy składnik szlaku sygnałowego Wnt. Mutacje te, w szczególności wpływające na serynę 45, prowadzą do stabilizacji i akumulacji β -kateniny, co skutkuje konstytutywną aktywacją szlaku Wnt. Aktywacja ta jest znanym czynnikiem napędzającym proliferację komórek i nowotworzenie w guzie Wilmsa, dzięki czemu Wilms2 jest cennym modelem do zrozumienia, w jaki sposób nieprawidłowa sygnalizacja Wnt przyczynia się do rozwoju i progresji nowotworów z mutacjami WT1.

Pod względem fenotypu, komórki Wilms2 wykazują morfologię podobną do mezenchymalnej, wykazując ekspresję wimentyny i brak markerów nabłonkowych, takich jak cytokeratyna. Jest to zgodne z charakterystyką zrębu guza i podkreśla rolę WT1 w regulacji przemian mezenchymalno-nabłonkowych podczas rozwoju nerek. Analizy proteomiczne Wilms2 zidentyfikowały aktywację kilku receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK), w tym PDGFR β i AXL, o których wiadomo, że wspierają przeżycie i proliferację komórek nowotworowych. Dodatkowo aktywowane są również szlaki niższego rzędu, takie jak MAPK i PI3K/AKT, co dodatkowo przyczynia się do złośliwych właściwości komórek Wilms2.

Ogólnie rzecz biorąc, linia komórkowa Wilms2 służy jako podstawowe narzędzie do badania mechanizmów molekularnych guza Wilmsa spowodowanego utratą WT1 i nieprawidłową sygnalizacją Wnt. Jej cechy genetyczne i fenotypowe stanowią solidną platformę do badania potencjalnych celów terapeutycznych i zrozumienia roli kluczowych szlaków sygnałowych w patologii guzów Wilmsa z komponentem mezenchymalnym.

Organism Człowiek**Tissue** Nerka**Disease** Guz Wilmsa**Applications** Model hodowli komórkowej in vitro. Badania biochemiczne**Charakterystyka****Age** 1 rok**Gender** Mężczyzna

Komórki Wilmsa2 | 300413**Ethnicity** Kaukaski**Morphology** Wrzecionowaty kształt**Cell type** Komórki Wilmsa**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** Wilms2 (numer katalogowy Cytion 300413)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SE**Depositor** B. Royer-Pokora**Dane biomolekularne****Mutational profile** Status mutacji WT1: homozygotyczny c.149 C>A, p.R326x, LOH: 11p11-11pter, status mutacji CTNNB1: heterozygotyczny del TCT>TAT, p.S45Y**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. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Komórki Wilmsa2 | 300413**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 probówki 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 Wilmsa2 | 300413

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 fiołki 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 fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki 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 wykluczane 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: 11,11
D13S317: 9,11
D16S539: 9,9
D5S818: 11,11
D7S820: 10,11
TH01: 6,6
TPOX: 8,11
vWA: 15,19
D3S1358: 15,15
D21S11: 29,32.2
D18S51: 12,17
Penta E: 11,15
Penta D: 10,12
D8S1179: 14,16
FGA: 21,21

Komórki Wilmsa2 | 300413

Allele HLA

A*: '01:01:01, '02:01:01

B*: '15:01:01, '57:01:01

C*: '03:03:01, '07:01:01

DRB1*: '04:01:01, '07:01:01

DQA1*: '02:01:01, '03:01:01

DQB1*: '03:02:01, '03:03:02

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

E: '01:01:01, '01:03:02