

Komórki Wilmsa8 | 300416**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa Wilms8 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.1168 C>T, p.R390X), prowadzącą do całkowitej utraty funkcji WT1. WT1 ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozwoju nerek, a jego inaktywacja jest powszechną cechą niektórych agresywnych podtypów guza Wilmsa, szczególnie tych, które wykazują różnicowanie mezenchymalne. Wilms8 stanowi zatem cenny model do badania wpływu utraty WT1 na nowotworzenie, szczególnie w kontekście guzów Wilmsa, które powstają z wyraźnym komponentem zrębu.

Oprócz mutacji WT1, komórki Wilms8 zawierają mutację w genie CTNNB1 (p.S45A), który koduje β -kateninę, kluczowy regulator szlaku sygnałowego Wnt. Mutacja przy serynie 45 zaburza normalny proces fosforylacji, który prowadzi do degradacji β -kateniny, powodując jej stabilizację i akumulację w jądrze. Skutkuje to konstytutywną aktywacją sygnalizacji Wnt, która napędza proliferację komórek i przyczynia się do onkogennych właściwości linii komórkowej Wilms8. Wzajemne oddziaływanie między utratą WT1 a nieprawidłową sygnalizacją Wnt w Wilms8 sprawia, że jest to kluczowy model do zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tych szlaków w biologii guza Wilmsa.

Komórki Wilms8 wykazują fenotyp mezenchymalny, charakteryzujący się ekspresją wimentyny i brakiem markerów nabłonkowych, takich jak cytokeratyna. Jest to zgodne z różnicowaniem zrębu obserwowanym w pierwotnym guzie. Komórki wykazują ograniczoną zdolność do dalszego różnicowania mezenchymalnego, takiego jak tworzenie komórek mięśniopodobnych w określonych warunkach. Analizy proteomiczne Wilmsa8 ujawniły aktywację wielu receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK), w tym PDGFR β i AXL, które są zaangażowane w kluczowe procesy, takie jak przeżycie komórek, migracja i proliferacja. Aktywacja dalszych szlaków sygnałowych, w szczególności szlaków MAPK i PI3K/AKT, dodatkowo przyczynia się do agresywnych cech komórek Wilms8.

Ogólnie rzecz biorąc, linia komórkowa Wilms8 służy jako podstawowe narzędzie do badania molekularnych podstaw guza Wilmsa spowodowanego utratą WT1 i nieprawidłową sygnalizacją Wnt. Jej cechy genetyczne i fenotypowe sprawiają, że jest to solidna platforma do badania interakcji między tymi krytycznymi szlakami i do identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych w guzach Wilmsa z komponentem zrębu.

Organism Człowiek**Tissue** Nerka**Disease** Guz Wilmsa**Applications** Model hodowli komórkowej in vitro. Badania biochemiczne**Charakterystyka****Age** 8 miesięcy**Gender** Mężczyzna

Komórki Wilmsa8 | 300416**Ethnicity** Kaukaski**Morphology** Wrzecionowaty kształt**Cell type** Komórki Wilmsa**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** Wilms8 (numer katalogowy Cytion 300416)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SJ**Depositor** B. Royer-Pokora**Dane biomolekularne****Mutational profile** Status mutacji WT1: homozygotyczny c.1168C>T, p.390x, LOH: , Status mutacji CTNNB1: heterozygotyczny TCT>GCT, p.S45A**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 Wilmsa8 | 300416**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 Wilmsa8 | 300416

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 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: 8,9
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

Komórki Wilmsa8 | 300416

Allele HLA

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