

Wilms8-celler | 300416

Allmän information

Description

Wilms8-cellinjen härrör från en primär Wilms-tumör hos en pediatrik patient med en WT1-mutation i arvsmassan. Denna cellinje kännetecknas av en homozygot nonsensmutation i WT1-genen (c.1168 C>T, p.R390X), vilket leder till en fullständig förlust av WT1-funktionen. WT1 är avgörande för normal njurutveckling och dess inaktivering är ett vanligt inslag i vissa aggressiva subtyper av Wilms tumör, särskilt de som uppvisar mesenkymal differentiering. Wilms8 utgör därför en värdefull modell för att studera effekterna av WT1-förlust på tumörutvecklingen, särskilt i samband med Wilms-tumörer som uppkommer med en uttalad stromal komponent.

Förutom WT1-mutationen har Wilms8-cellerna en mutation i CTNNB1-genen (p.S45A), som kodar för β -katenin, en viktig regulator av Wnt-signalvägen. Mutationen på serin 45 stör den normala fosforyleringsprocessen som leder till nedbrytning av β -Catenin, vilket gör att det stabiliseras och ansamlas i cellkärnan. Detta resulterar i en konstitutiv aktivering av Wnt-signalering, vilket driver cellproliferation och bidrar till de onkogen egenskaperna hos Wilms8-cellinjen. Samspelet mellan WT1-förlust och avvikande Wnt-signalering i Wilms8 gör den till en viktig modell för att förstå de molekylära mekanismer som ligger bakom dessa vägar i Wilms tumörbiologi.

Wilms8-cellerna uppvisar en mesenkymal fenotyp, som kännetecknas av uttryck av vimentin och avsaknad av epitelmarkörer som cytokeratin. Detta stämmer överens med den stromala differentiering som observerades i den ursprungliga tumören. Cellerna uppvisar en begränsad förmåga att genomgå ytterligare mesenkymal differentiering, till exempel att bilda muskelliknande celler under specifika förhållanden. Proteomiska analyser av Wilms8 har visat att flera receptortyrosinkinaser (RTK) aktiveras, bland annat PDGFR β och AXL, vilka är involverade i viktiga processer som cellöverlevnad, migration och proliferation. Aktiveringen av nedströms signalvägar, i synnerhet MAPK- och PI3K/AKT-vägarna, bidrar ytterligare till Wilms8-cellernas aggressiva egenskaper.

Sammantaget fungerar Wilms8-cellinjen som ett viktigt verktyg för att undersöka den molekylära grunden för Wilms-tumör som drivs av WT1-förlust och avvikande Wnt-signalering. Dess genetiska och fenotypiska egenskaper gör den till en robust plattform för att studera interaktionen mellan dessa kritiska signalvägar och för att identifiera potentiella terapeutiska mål i Wilms-tumörer med en stromal komponent.

Organism Människan

Tissue Njurar

Disease Wilms tumör

Applications In vitro cellodlingsmodell. Biokemiska studier

Egenskaper

Age 8 månader

Gender Man

Wilms8-celler | 300416**Ethnicity** Kaukasisk**Morphology** Spindelformad**Cell type** Wilms-celler**Growth properties** Följsam**Lagstadgade uppgifter****Citation** Wilms8 (Cytion katalognummer 300416)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SJ**Depositor** B. Royer-Pokora**Biomolekylära data****Mutational profile** WT1-mutationsstatus: homozygot c.1168C>T, p.390x, LOH: , CTNNB1-mutationsstatus: heterozygot TCT>GCT, p.S45A**Hantering****Culture Medium** MSCGM-kit (från Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.

Wilms8-celler | 300416

Freeze medium

Som kryokonserveringsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

Thawing and Culturing Cells

1. Bekräfta att flaskan är djupfrysad vid leverans, eftersom cellerna skickas på torris för att bibehålla optimala temperaturer under transporten.
2. Vid mottagandet ska du antingen förvara kryovialen omedelbart vid temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ för att säkerställa att cellernas integritet bevaras, eller gå vidare till steg 3 om omedelbar odling krävs.
3. Vid omedelbar odling ska injektionsflaskan snabbt tinas genom att den sänks ned i ett $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vattenbad med rent vatten och ett antimikrobiellt medel och omrörs försiktigt i 40-60 sekunder tills en liten isklump återstår.
4. Utför alla efterföljande steg under sterila förhållanden i en flödeskuv och desinficera kryovialerna med 70 % etanol innan de öppnas.
5. Öppna försiktigt den desinficerade flaskan och överför cellsuspensionen till ett 15 ml centrifugrör som innehåller 8 ml rumstempererat odlingsmedium och blanda försiktigt.
6. Centrifugera blandningen vid $300 \times g$ i 3 minuter för att separera cellerna och kassera försiktigt supernatanten som innehåller resterande frysmedium.
7. Resuspendera försiktigt cellpelleten i 10 ml färskt odlingsmedium. För adherenta celler, fördela suspensionen mellan två T25-kulturkanter; för suspensionskulturer, överför allt medium till en T25-kolv för att främja effektiv cellinteraktion och tillväxt.
8. Följ fastställda subkulturprotokoll för fortsatt tillväxt och underhåll av cellinjen, vilket säkerställer tillförlitliga experimentella resultat.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befuktad atmosfär.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

Wilms8-celler | 300416

Shipping Conditions

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka -78 °C under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överförs till lämplig förvaring.

Storage Conditions

För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasma-diagnostik.

För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.

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