

Bunky Wilms8 | 300416**Všeobecné informácie****Description**

Bunková línia Wilms8 bola odvodená z primárneho Wilmsovho nádoru u detského pacienta so zárodočnou mutáciou WT1. Táto bunková línia je charakterizovaná homozygotnou nezmyselnou mutáciou v géne WT1 (c.1168 C>T, p.R390X), ktorá vedie k úplnej strate funkcie WT1. WT1 je kľúčový pre normálny vývoj obličiek a jeho inaktivácia je spoločným znakom určitých agresívnych podtypov Wilmsovho nádoru, najmä tých, ktoré vykazujú mezenchymálnu diferenciáciu. Wilms8 preto predstavuje cenný model na štúdium účinkov straty WT1 na tumorigenézu, najmä v kontexte Wilmsových nádorov, ktoré vznikajú s výraznou stromálnou zložkou.

Okrem mutácie WT1 majú bunky Wilms8 mutáciu v géne CTNNB1 (p.S45A), ktorý kóduje β -katenín, kľúčový regulátor signálnej dráhy Wnt. Mutácia na seríne 45 narúša normálny proces fosforylácie, ktorý vedie k degradácii β -Cateninu, čo spôsobuje jeho stabilizáciu a akumuláciu v jadre. To má za následok konstitutívnu aktiváciu signalizácie Wnt, ktorá poháňa proliferáciu buniek a prispieva k onkogénnym vlastnostiam bunkovej línie Wilms8. Vzájomné pôsobenie medzi stratou WT1 a aberantnou signalizáciou Wnt v Wilms8 z nej robí kľúčový model na pochopenie molekulárnych mechanizmov, ktoré sú základom týchto dráh v biológii nádorov Wilms.

Bunky Wilms8 vykazujú mezenchýmový fenotyp, ktorý je charakterizovaný expresiou vimentínu a absenciou epitelových markerov, ako je cytokeratín. To zodpovedá stromálnej diferenciácii pozorovanej v pôvodnom nádore. Bunky vykazujú obmedzenú schopnosť podstúpiť ďalšiu mezenchymálnu diferenciáciu, napríklad tvorbu buniek podobných svalom za špecifických podmienok. Proteomické analýzy Wilmsovho nádoru odhalili aktiváciu viacerých receptorových tyrozínkináz (RTK) vrátane PDGFR β a AXL, ktoré sa podieľajú na kľúčových procesoch, ako je prežívanie, migrácia a proliferácia buniek. Aktivácia nadväzujúcich signálnych dráh, najmä dráh MAPK a PI3K/AKT, ďalej prispieva k agresívnym vlastnostiam buniek Wilms8.

Celkovo slúži bunková línia Wilms8 ako základný nástroj na skúmanie molekulárnej podstaty Wilmsovho nádoru spôsobeného stratou WT1 a aberantnou signalizáciou Wnt. Jej genetické a fenotypové vlastnosti z nej robia robustnú platformu na štúdium interakcie medzi týmito kritickými dráhami a na identifikáciu potenciálnych terapeutických cieľov v nádoroch Wilms so stromálnou zložkou.

Organism Ľudské**Tissue** Obličky**Disease** Wilmsov nádor**Applications** Model bunkovej kultúry in vitro. Biochemické štúdie**Charakteristika****Age** 8 mesiacov**Gender** Muži**Ethnicity** Kaukazský

Bunky Wilms8 | 300416**Morphology** Vreteno v tvare vretena**Cell type** Wilmsove bunky**Growth properties** Adherent**Regulačné údaje****Citation** Wilms8 (katalógové číslo Cytion 300416)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SJ**Biomolekulárne údaje****Mutational profile** Stav mutácie WT1: homozygotná c.1168C>T, p.390x, LOH: , stav mutácie CTNNB1: heterozygotná TCT>GCT, p.S45A**Spracovanie****Culture Medium** Súprava MSCGM (od spoločnosti Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredujte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.**Freeze medium** Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

Bunky Wilms8 | 300416**Thawing and
Culturing Cells**

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žiadne

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Bunky Wilms8 | 300416

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.

Alely 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