NCI-H1299-RFP-Zellen

300272

Die NCI-H1299 RFP-Zellen, die so modifiziert wurden, dass sie einen Reporter im DAPK1-Gen enthalten, sind nicht nur für die Untersuchung spezifischer Genaktivierung nützlich, sondern ermöglichen auch ein umfassenderes Verständnis der globalen Reaktion von Zellen auf epigenetische Medikamente. Mit Hilfe einer Technik, die als Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) bezeichnet wird, waren die Forscher in der Lage, Veränderungen an den Stellen im Genom aufzuzeigen, an denen die Transkription als Reaktion auf eine Behandlung mit DNMTi (DAC), HDACi (SAHA oder SB939) oder deren Kombinationen beginnt. Diese Methode zeigt nicht nur die erwartete Reaktivierung des DAPK1-Gens, sondern auch die Entstehung neuer Transkriptionsstartstellen, so genannter behandlungsinduzierter, nicht annotierter TSSs (TINATs), vor allem unter Medikamentenbehandlung. Diese neuen Startstellen befinden sich in der Regel in Regionen des Genoms, in denen normalerweise keine Proteine gebildet werden, und führen zur Entstehung neuer RNA-Moleküle, die potenziell für Proteine kodieren könnten. Weitere Analysen zeigen, dass diese neuen RNA-Moleküle manchmal mit bereits vorhandenen fusionieren können, um so genannte TINAT-Exon-Fusionstranskripte zu bilden. Je nachdem, wie diese Transkripte gespleißt werden, können sie zu neuen, atypischen Proteinen werden. Dieser Prozess wurde durch Labortechniken bestätigt, die zeigen, dass diese Transkripte tatsächlich zur Produktion neuer Proteinformen führen können. Diese Proteine könnten innerhalb der Zelle abnorm interagieren oder vom Immunsystem als fremd erkannt werden, was neue Angriffspunkte für die Krebstherapie bieten könnte.
Die Aktivierung dieser TINATs ist mit komplizierten Veränderungen der DNA-Methylierung und der Histon-Modifikationen verbunden, was eine komplexe Interaktion zwischen diesen epigenetischen Faktoren unter medikamentöser Behandlung verdeutlicht. Insbesondere der kombinierte Einsatz von DAC und SB939 zeigt eine größere Wirkung und steigert die Expression dieser neuartigen Transkripte stärker als die alleinige Anwendung eines der beiden Medikamente. Das Verständnis dieser Wechselwirkungen und ihrer Ergebnisse trägt zur Klärung der Frage bei, wie epigenetische Therapien das Zellverhalten verändern, und eröffnet Möglichkeiten für neue Krebsbehandlungen, die sich diese komplexen molekularen Veränderungen zunutze machen.

ALLGEMEINE INFORMATIONEN

Beschreibung

Die NCI-H1299 RFP-Zellen, die so modifiziert wurden, dass sie einen Reporter im DAPK1-Gen enthalten, sind nicht nur für die Untersuchung spezifischer Genaktivierung nützlich, sondern ermöglichen auch ein umfassenderes Verständnis der globalen Reaktion von Zellen auf epigenetische Medikamente. Mit Hilfe einer Technik, die als Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) bezeichnet wird, waren die Forscher in der Lage, Veränderungen an den Stellen im Genom aufzuzeigen, an denen die Transkription als Reaktion auf eine Behandlung mit DNMTi (DAC), HDACi (SAHA oder SB939) oder deren Kombinationen beginnt. Diese Methode zeigt nicht nur die erwartete Reaktivierung des DAPK1-Gens, sondern auch die Entstehung neuer Transkriptionsstartstellen, so genannter behandlungsinduzierter, nicht annotierter TSSs (TINATs), vor allem unter Medikamentenbehandlung. Diese neuen Startstellen befinden sich in der Regel in Regionen des Genoms, in denen normalerweise keine Proteine gebildet werden, und führen zur Entstehung neuer RNA-Moleküle, die potenziell für Proteine kodieren könnten. Weitere Analysen zeigen, dass diese neuen RNA-Moleküle manchmal mit bereits vorhandenen fusionieren können, um so genannte TINAT-Exon-Fusionstranskripte zu bilden. Je nachdem, wie diese Transkripte gespleißt werden, können sie zu neuen, atypischen Proteinen werden. Dieser Prozess wurde durch Labortechniken bestätigt, die zeigen, dass diese Transkripte tatsächlich zur Produktion neuer Proteinformen führen können. Diese Proteine könnten innerhalb der Zelle abnorm interagieren oder vom Immunsystem als fremd erkannt werden, was neue Angriffspunkte für die Krebstherapie bieten könnte.
Die Aktivierung dieser TINATs ist mit komplizierten Veränderungen der DNA-Methylierung und der Histon-Modifikationen verbunden, was eine komplexe Interaktion zwischen diesen epigenetischen Faktoren unter medikamentöser Behandlung verdeutlicht. Insbesondere der kombinierte Einsatz von DAC und SB939 zeigt eine größere Wirkung und steigert die Expression dieser neuartigen Transkripte stärker als die alleinige Anwendung eines der beiden Medikamente. Das Verständnis dieser Wechselwirkungen und ihrer Ergebnisse trägt zur Klärung der Frage bei, wie epigenetische Therapien das Zellverhalten verändern, und eröffnet Möglichkeiten für neue Krebsbehandlungen, die sich diese komplexen molekularen Veränderungen zunutze machen.

Gewebe	Lunge
Krankheit	Großzelliges Karzinom
Metastasenherd	Primärtumorlokalisation (Lunge)

Anwendungen

Forschung im Bereich der epigenetischen Therapie; Reaktivierung des DAPK1-Gens; Studien zum Ansprechen auf DNMTi- und HDACi-Wirkstoffe; behandlungsinduzierte, nicht annotierte Transkriptionsstartstellen (TINATs); CAGE-Transkriptomik; Analyse von Fusionstranskripten; atypische Proteinproduktion aus kryptischen Promotoren; Screening epigenetischer Wirkstoffkombinationen

Cytion GmbH
Nikola-Tesla-Str. 3
69124 Heidelberg
Tel: +49 (0)6221 405780
info@cytion.com
cytion.com

Registered office Heidelberg
VAT ID: DE283292917
Local court Mannheim - HRB 714394
CEO / Geschäftsführer: Jonathan Steubing

Banking information
Sparkasse Heidelberg
IBAN: DE35 6725 0020 0009 2076 86
BIC: SOLADES1HDB

KLASSIFIZIERUNG

Organismus	Mensch
Wachstumseigenschaften	Anhänger
GVO-Status	GMO-S1

Angaben zum GVO-Status

GMO-S1: This NCI-H1299 derivative (DKFZ #P-1045) contains a stably silenced EGFP reporter in the DAPK1 locus enabling epigenetic reactivation readout. G418-resistance cassette present. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Biologische Sicherheitsstufe	1

MERKMALE

Morphologie	Epithelähnlich
Zelltyp	Epithelzellen
Verdopplungszeit	ca. 24 bis 36 Stunden

BEZEICHNER

Quellenangabe

NCI-H1299-EGFP, mit G418-Resistenz und stillgelegtem Reporter (DKFZ # P-1045) (Cytion-Katalognummer 300272)

NCBI-Steuer-ID	9606
Cellosaurus	CVCL_XB25

HANDHABUNG UND KULTUR

Nährmedium

RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiles Glutamin, w: 2,0 g/L $NaHCO_3$ (Cytion-Artikelnummer 820700a)

Inkubationsatmosphäre	37°C, 5%CO_2, befeuchtete Atmosphäre.

Nahrungsergänzungsmittel

Ergänzen Sie das Medium mit 10% FBS

Dissoziationsreagenz	Accutase

Subkultivierung

Entfernen Sie das alte Medium von den adhärenten Zellen und waschen Sie sie mit PBS, das kein Kalzium und Magnesium enthält. Für T25-Kolben 3-5 ml PBS und für T75-Kolben 5-10 ml verwenden. Anschließend werden die Zellen vollständig mit Accutase bedeckt, wobei 1-2 ml für T25-Kolben und 2,5 ml für T75-Kolben verwendet werden. Lassen Sie die Zellen 8-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, um sie abzulösen. Nach der Inkubation mischen Sie die Zellen vorsichtig mit 10 ml Medium, um sie zu resuspendieren, und zentrifugieren sie dann 3 Minuten lang bei 300xg. Den Überstand verwerfen, die Zellen in frischem Medium resuspendieren und in neue Kolben überführen, die bereits frisches Medium enthalten.

Split-Verhältnis	1 bis 5
Aussaatdichte	1 bis 3 × 10^4 Zellen/cm^2
Flüssigkeitswechsel	2 bis 3 Mal pro Woche

Auftauen und Kultivierung

Confirm that the vial remains deeply frozen upon delivery, as cells are shipped on dry ice to maintain optimal temperatures during transit.
Upon receipt, either store the cryovial immediately at temperatures below -150°C to ensure the preservation of cellular integrity, or proceed to step 3 if immediate culturing is required.
For immediate culturing, swiftly thaw the vial by immersing it in a 37°C water bath with clean water and an antimicrobial agent, agitating gently for 40-60 seconds until a small ice clump remains.
Perform all subsequent steps under sterile conditions in a flow hood, disinfecting the cryovial with 70% ethanol before opening.
Carefully open the disinfected vial and transfer the cell suspension into a 15 ml centrifuge tube containing 8 ml of room-temperature culture medium, mixing gently.
Centrifuge the mixture at 300 x g for 3 minutes to separate the cells and carefully discard the supernatant containing residual freezing medium.
Gently resuspend the cell pellet in 10 ml of fresh culture medium. For adherent cells, divide the suspension between two T25 culture flasks; for suspension cultures, transfer all the medium into one T25 flask to promote effective cell interaction and growth.
Adhere to established subculture protocols for continued growth and maintenance of the cell line, ensuring reliable experimental outcomes.

QUALITÄTSKONTROLLE UND KRYOKONSERVIERUNG

Sterilität

Eine Kontamination mit Mykoplasmen wird sowohl durch PCR-basierte Assays als auch durch lumineszenzbasierte Mykoplasmen-Nachweisverfahren ausgeschlossen.
Um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Hefen vorliegt, werden die Zellkulturen täglich visuell überprüft.

Gefriermedium	Als Kryokonservierungsmedium verwenden wir komplettes Wachstumsmedium (einschließlich FBS) + 10 % DMSO für eine angemessene Lebensfähigkeit nach dem Auftauen oder CM-1 (Cytion Katalognummer 800100), das optimierte Osmoprotektoren und Stoffwechselstabilisatoren enthält, um die Erholung zu verbessern und kryoinduzierten Stress zu reduzieren.

Lagerbedingungen

Zur Langzeitkonservierung werden die Fläschchen in flüssigem Stickstoff bei etwa -150 bis -196 °C gelagert. Eine Lagerung bei -80 °C ist nur als kurzer Zwischenschritt vor der Überführung in flüssigen Stickstoff akzeptabel.

Versandbedingungen

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa -78 °C aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

RECHTLICHES UND SICHERHEIT

Sicherheitshinweise

Wenn Sie planen, ein Kryovial in flüssigem Stickstoff zu lagern, um es später aufzutauen, müssen Sie strenge Sicherheitsmaßnahmen einhalten. Geeignete Schutzhandschuhe und -kleidung sind unerlässlich, und beim Transfer der gefrorenen Proben in den oder aus dem Flüssigstickstofftank ist das Tragen einer Gesichtsmaske oder einer Schutzbrille erforderlich. Damit soll die Verletzungsgefahr durch mögliche Explosionen der Kryovials bei der Entnahme, die zum Herausschleudern von scharfen Fragmenten führen können, verringert werden.

Garantie

Bei Cytion stehen wir hinter der Qualität und Lebensfähigkeit unserer Produkte.
Wir garantieren, dass unsere Zellen zu Beginn der Kultur für 60 Tage nach dem Versand aus unseren Einrichtungen lebensfähig sind.
Wir versichern, dass alle Materialien mit den im Analysezertifikat und/oder Produktblatt beschriebenen Spezifikationen übereinstimmen
Ausführliche Informationen finden Sie in unserer <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Garantieerklärung

Es gelten Vereinbarungen mit Dritten	Yes