Cellule NCI-H1299-RFP

300272

Le cellule NCI-H1299 RFP, modificate per includere un reporter nel gene DAPK1, non sono solo utili per studiare l'attivazione di un gene specifico, ma forniscono anche una comprensione più ampia di come le cellule reagiscono ai farmaci epigenetici a livello globale. Utilizzando una tecnica chiamata Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), i ricercatori sono stati in grado di dettagliare i cambiamenti nei punti di inizio della trascrizione all'interno del genoma in risposta ai trattamenti con DNMTi (DAC), HDACi (SAHA o SB939) o alle loro combinazioni. Questo metodo rivela non solo l'attesa riattivazione del gene DAPK1, ma anche l'emergere di nuovi siti di inizio della trascrizione, chiamati TSS non annotati indotti dal trattamento (TINAT), soprattutto in caso di trattamento farmacologico. Questi nuovi siti di inizio sono tipicamente situati in regioni del genoma che di solito non producono proteine e portano alla creazione di nuove molecole di RNA che potrebbero potenzialmente codificare per le proteine.
Ulteriori analisi mostrano che queste nuove molecole di RNA possono talvolta fondersi con quelle esistenti per formare i cosiddetti trascritti di fusione TINAT-esone. A seconda del modo in cui questi trascritti vengono impiantati, possono tradursi in nuove proteine atipiche. Questo processo è stato confermato da tecniche di laboratorio che dimostrano che questi trascritti possono effettivamente portare alla produzione di nuove forme proteiche. Queste proteine potrebbero interagire in modo anomalo all'interno della cellula o essere riconosciute come estranee dal sistema immunitario, offrendo potenzialmente nuovi bersagli per la terapia del cancro.
L'attivazione di queste TINAT comporta intricati cambiamenti sia nella metilazione del DNA che nelle modificazioni degli istoni, illustrando una complessa interazione tra questi fattori epigenetici durante il trattamento farmacologico. In particolare, l'uso combinato di DAC e SB939 mostra un effetto maggiore, aumentando l'espressione di questi nuovi trascritti più che quando uno dei due farmaci è usato da solo. La comprensione di queste interazioni e dei loro risultati aiuta a chiarire come le terapie epigenetiche alterino il comportamento delle cellule e apre la possibilità di nuovi trattamenti antitumorali che sfruttino questi complessi cambiamenti molecolari.

INFORMAZIONI GENERALI

Descrizione

Le cellule NCI-H1299 RFP, modificate per includere un reporter nel gene DAPK1, non sono solo utili per studiare l'attivazione di un gene specifico, ma forniscono anche una comprensione più ampia di come le cellule reagiscono ai farmaci epigenetici a livello globale. Utilizzando una tecnica chiamata Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), i ricercatori sono stati in grado di dettagliare i cambiamenti nei punti di inizio della trascrizione all'interno del genoma in risposta ai trattamenti con DNMTi (DAC), HDACi (SAHA o SB939) o alle loro combinazioni. Questo metodo rivela non solo l'attesa riattivazione del gene DAPK1, ma anche l'emergere di nuovi siti di inizio della trascrizione, chiamati TSS non annotati indotti dal trattamento (TINAT), soprattutto in caso di trattamento farmacologico. Questi nuovi siti di inizio sono tipicamente situati in regioni del genoma che di solito non producono proteine e portano alla creazione di nuove molecole di RNA che potrebbero potenzialmente codificare per le proteine.
Ulteriori analisi mostrano che queste nuove molecole di RNA possono talvolta fondersi con quelle esistenti per formare i cosiddetti trascritti di fusione TINAT-esone. A seconda del modo in cui questi trascritti vengono impiantati, possono tradursi in nuove proteine atipiche. Questo processo è stato confermato da tecniche di laboratorio che dimostrano che questi trascritti possono effettivamente portare alla produzione di nuove forme proteiche. Queste proteine potrebbero interagire in modo anomalo all'interno della cellula o essere riconosciute come estranee dal sistema immunitario, offrendo potenzialmente nuovi bersagli per la terapia del cancro.
L'attivazione di queste TINAT comporta intricati cambiamenti sia nella metilazione del DNA che nelle modificazioni degli istoni, illustrando una complessa interazione tra questi fattori epigenetici durante il trattamento farmacologico. In particolare, l'uso combinato di DAC e SB939 mostra un effetto maggiore, aumentando l'espressione di questi nuovi trascritti più che quando uno dei due farmaci è usato da solo. La comprensione di queste interazioni e dei loro risultati aiuta a chiarire come le terapie epigenetiche alterino il comportamento delle cellule e apre la possibilità di nuovi trattamenti antitumorali che sfruttino questi complessi cambiamenti molecolari.

Tessuto	Polmone
Malattia	Carcinoma a grandi cellule
Sito metastatico	Sede del tumore primario (polmone)

Applicazioni

Ricerca sulla terapia epigenetica; riattivazione del gene DAPK1; studi sulla risposta ai farmaci DNMTi e HDACi; siti di inizio trascrizione non annotati indotti dal trattamento (TINAT); trascrittomica CAGE; analisi dei trascritti di fusione; produzione di proteine atipiche da promotori criptici; screening di combinazioni di farmaci epigenetici

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

CLASSIFICAZIONE

Organismo	Umano
Proprietà di crescita	Aderente
Presenza di OGM	GMO-S1

Dettagli sullo stato degli OGM

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.

Livello di biosicurezza	1

CARATTERISTICHE

Morfologia	Simile all'epitelio
Tipo di cellula	Cellule epiteliali
Tempo di raddoppio	circa da 24 a 36 ore

IDENTIFICATORI

Riferimento bibliografico

NCI-H1299-EGFP, con resistenza al G418 e reporter silenziato (DKFZ n. P-1045) (codice catalogo Cytion 300272)

Codice fiscale NCBI	9606
Cellosaurus	CVCL_XB25

MANIPOLAZIONE E COLTURA

Terreno di coltura

RPMI 1640, w: 2,0 mM di glutammina stabile, w: 2,0 g/L di NaHCO3 (articolo Cytion numero 820700a)

Atmosfera di incubazione	37°C, 5%CO2, atmosfera umidificata.

Integratori

Integrare il terreno di coltura con il 10% di FBS

Reagente di dissociazione	Accutase

Subcoltura

Rimuovere il vecchio terreno dalle cellule aderenti e lavarle con PBS privo di calcio e magnesio. Per le fiasche T25, utilizzare 3-5 ml di PBS e per le fiasche T75, 5-10 ml. Quindi, coprire completamente le cellule con Accutase, utilizzando 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75. Lasciare incubare le cellule a temperatura ambiente per 8-10 minuti per staccarle. Dopo l'incubazione, mescolare delicatamente le cellule con 10 ml di terreno per risospenderle, quindi centrifugare a 300xg per 3 minuti. Scartare il surnatante, risospendere le cellule in terreno fresco e trasferirle in nuove fiasche contenenti terreno fresco.

Rapporto di frazionamento	Da 1 a 5
Densità di semina	da 1 a 3 × 10^4 cellule/cm^2
Rinnovo dei fluidi	da 2 a 3 volte alla settimana

Scongelamento e coltura

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.

CONTROLLO DI QUALITÀ E CRIOCONSERVAZIONE

Sterilità

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.
Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.

Terreno di coltura congelato	Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelamento, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

Condizioni di conservazione

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Condizioni di spedizione

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

ASPETTI LEGALI E DI SICUREZZA

Misure di sicurezza

Quando si prevede di conservare una crioviale in azoto liquido per un futuro scongelamento, è obbligatorio attenersi a rigorose misure di sicurezza. Guanti e indumenti protettivi appropriati sono essenziali e l'uso di una maschera facciale o di occhiali di sicurezza è richiesto durante il trasferimento dei campioni congelati da o verso il serbatoio di azoto liquido. Questo per ridurre il rischio di lesioni dovute a potenziali esplosioni di crioviali al momento della rimozione, che possono provocare la proiezione di frammenti taglienti.

Garanzia

Noi di Cytion garantiamo la qualità e la vitalità dei nostri prodotti.
Garantiamo che le nostre cellule saranno vitali all'inizio della coltura per 60 giorni dopo la spedizione dai nostri stabilimenti.
Assicuriamo che tutti i materiali sono conformi alle specifiche descritte nel Certificato di Analisi e/o nella Scheda Prodotto
Per tutti i dettagli, consultare la nostra <a href=""/Chi-siamo/Garanzia/"" hreflang=""x-default"">Dichiarazione di Garanzia

Si applicano gli accordi con terze parti	Yes