NCI-H1299-RFP-cellen

300272

De NCI-H1299 RFP-cellen, aangepast om een reporter in het DAPK1-gen op te nemen, zijn niet alleen nuttig voor het bestuderen van specifieke genactivering, maar bieden ook een breder inzicht in hoe cellen globaal reageren op epigenetische geneesmiddelen. Door gebruik te maken van een techniek genaamd Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), zijn onderzoekers in staat geweest om veranderingen in waar transcriptie start in het genoom in detail te bekijken als reactie op behandelingen met DNMTi (DAC), HDACi (SAHA of SB939), of hun combinaties. Deze methode onthult niet alleen de verwachte reactivering van het DAPK1-gen, maar ook het ontstaan van nieuwe transcriptiestartsites, de zogenaamde treatment-induced non-annotated TSSs (TINATs), vooral onder behandeling met geneesmiddelen. Deze nieuwe startplaatsen bevinden zich meestal in regio's van het genoom die gewoonlijk geen eiwitten produceren en leiden tot het ontstaan van nieuwe RNA-moleculen die mogelijk kunnen coderen voor eiwitten.
Verdere analyse laat zien dat deze nieuwe RNA-moleculen soms kunnen samensmelten met bestaande moleculen en zo zogenaamde TINAT-exon fusietranscripten vormen. Afhankelijk van hoe deze transcripten worden gesplitst, kunnen ze zich vertalen in nieuwe, atypische eiwitten. Dit proces is bevestigd door laboratoriumtechnieken die aantonen dat deze transcripten inderdaad kunnen leiden tot de productie van nieuwe eiwitvormen. Deze eiwitten kunnen een abnormale interactie aangaan binnen de cel of door het immuunsysteem worden herkend als lichaamsvreemd, wat mogelijk nieuwe doelwitten biedt voor kankertherapie.
De activering van deze TINATs gaat gepaard met ingewikkelde veranderingen in zowel DNA-methylering als histonmodificaties, wat een complexe interactie tussen deze epigenetische factoren onder behandeling met medicijnen illustreert. Met name het gecombineerde gebruik van DAC en SB939 heeft een groter effect en stimuleert de expressie van deze nieuwe transcripten meer dan wanneer een van beide geneesmiddelen alleen wordt gebruikt. Inzicht in deze interacties en hun resultaten helpt te verduidelijken hoe epigenetische therapieën het gedrag van cellen veranderen en opent mogelijkheden voor nieuwe kankerbehandelingen die gebruik maken van deze complexe moleculaire veranderingen.

ALGEMENE INFORMATIE

Beschrijving

De NCI-H1299 RFP-cellen, aangepast om een reporter in het DAPK1-gen op te nemen, zijn niet alleen nuttig voor het bestuderen van specifieke genactivering, maar bieden ook een breder inzicht in hoe cellen globaal reageren op epigenetische geneesmiddelen. Door gebruik te maken van een techniek genaamd Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), zijn onderzoekers in staat geweest om veranderingen in waar transcriptie start in het genoom in detail te bekijken als reactie op behandelingen met DNMTi (DAC), HDACi (SAHA of SB939), of hun combinaties. Deze methode onthult niet alleen de verwachte reactivering van het DAPK1-gen, maar ook het ontstaan van nieuwe transcriptiestartsites, de zogenaamde treatment-induced non-annotated TSSs (TINATs), vooral onder behandeling met geneesmiddelen. Deze nieuwe startplaatsen bevinden zich meestal in regio's van het genoom die gewoonlijk geen eiwitten produceren en leiden tot het ontstaan van nieuwe RNA-moleculen die mogelijk kunnen coderen voor eiwitten.
Verdere analyse laat zien dat deze nieuwe RNA-moleculen soms kunnen samensmelten met bestaande moleculen en zo zogenaamde TINAT-exon fusietranscripten vormen. Afhankelijk van hoe deze transcripten worden gesplitst, kunnen ze zich vertalen in nieuwe, atypische eiwitten. Dit proces is bevestigd door laboratoriumtechnieken die aantonen dat deze transcripten inderdaad kunnen leiden tot de productie van nieuwe eiwitvormen. Deze eiwitten kunnen een abnormale interactie aangaan binnen de cel of door het immuunsysteem worden herkend als lichaamsvreemd, wat mogelijk nieuwe doelwitten biedt voor kankertherapie.
De activering van deze TINATs gaat gepaard met ingewikkelde veranderingen in zowel DNA-methylering als histonmodificaties, wat een complexe interactie tussen deze epigenetische factoren onder behandeling met medicijnen illustreert. Met name het gecombineerde gebruik van DAC en SB939 heeft een groter effect en stimuleert de expressie van deze nieuwe transcripten meer dan wanneer een van beide geneesmiddelen alleen wordt gebruikt. Inzicht in deze interacties en hun resultaten helpt te verduidelijken hoe epigenetische therapieën het gedrag van cellen veranderen en opent mogelijkheden voor nieuwe kankerbehandelingen die gebruik maken van deze complexe moleculaire veranderingen.

Weefsel	Long
Ziekte	Grootcellig carcinoom
Plaats van uitzaaiingen	Locatie van de primaire tumor (long)

Toepassingen

Onderzoek naar epigenetische therapieën; reactivering van het DAPK1-gen; onderzoeken naar de respons op DNMTi- en HDACi-geneesmiddelen; door behandeling geïnduceerde, niet-geannoteerde TSS'en (TINAT's); CAGE-transcriptomica; analyse van fusietranscripten; productie van atypische eiwitten vanuit cryptische promotors; screening van epigenetische geneesmiddelencombinaties

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

CLASSIFICATIE

Organisme	Mens
Groei-eigenschappen	Aanhanger
GGO-status	GMO-S1

Details over de GGO-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.

Bioveiligheidsniveau	1

KENMERKEN

Morfologie	Epitheelachtig
Celtype	Epitheelcellen
Verdubbelingstijd	ongeveer 24 tot 36 uur

IDENTIFICATIEGEGEVENS

Bronvermelding

NCI-H1299-EGFP, met G418-resistentie en een uitgeschakelde reporter (DKFZ # P-1045) (Cytion-catalogusnummer 300272)

NCBI-belastingnummer	9606
Cellosaurus	CVCL_XB25

BEHANDELING EN KWEEK

Kweekmedium

RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiele Glutamine, w: 2,0 g/L $NaHCO_3$ (Cytion artikelnummer 820700a)

Incubatieomgeving	37°C, 5%CO_2, bevochtigde atmosfeer.

Supplementen

Vul het medium aan met 10% FBS

Dissociatiereagens	Accutase

Heruitplanten

Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenderen en vervolgens centrifugeren bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

Splitsingsverhouding	1 tot en met 5
Zaaidichtheid	1 tot 3 × 10^4 cellen/cm^2
Vloeistofverversing	2 tot 3 keer per week

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

Ontdooien en kweken

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.

KWALITEITSCONTROLE EN CRYOPRESERVATIE

Onvruchtbaarheid

Mycoplasmaverontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasmadetectiemethoden.
Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.

Kweekmedium invriezen	Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimedium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Opslagvoorwaarden

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Verzendvoorwaarden

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

JURIDISCHE EN VEILIGHEIDSASPECTEN

Veiligheidsmaatregelen

Wanneer men van plan is om een cryovial in vloeibare stikstof op te slaan om later te ontdooien, is het verplicht om strenge veiligheidsmaatregelen in acht te nemen. Passende beschermende handschoenen en kleding zijn essentieel en het gebruik van een gezichtsmasker of veiligheidsbril is vereist tijdens het overbrengen van bevroren monsters naar of uit de tank met vloeibare stikstof. Dit is om het risico op letsel door mogelijke cryoviale explosies bij het verwijderen te beperken, wat kan resulteren in de projectie van scherpe fragmenten.

Garantie

Bij Cytion staan we achter de kwaliteit en levensvatbaarheid van onze producten.
We garanderen dat onze cellen levensvatbaar zijn bij het begin van de kweek gedurende 60 dagen na verzending vanuit onze faciliteiten.
We verzekeren dat alle materialen voldoen aan de specificaties beschreven in het analysecertificaat en/of productblad
Raadpleeg voor volledige informatie onze <a href=""/Wie-zijn-wij/Garantie/"" hreflang=""x-default"">Garantieverklaring

Er gelden overeenkomsten met derden	Yes