

Cellule NCI-H1299-RFP | 300272

Informazioni generali

Description

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.

Organism

Umano

Tissue

Polmone

Disease

Carcinoma a grandi cellule

Metastatic site

Sede del tumore primario (polmone)

Applications

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

Caratteristiche

Morphology

Simile all'epitelio

Cell type

Cellule epiteliali

Cellule NCI-H1299-RFP | 300272

Growth properties	Aderente
--------------------------	----------

Dati normativi

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

Biosafety level	1
------------------------	---

NCBI_TaxID	9606
-------------------	------

CellosaurusAccession	CVCL_XB25
-----------------------------	-----------

GMO Status	GMO-S1: Questo derivato della linea NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) contiene un reporter EGFP stabilmente silenziato nel locus DAPK1, che consente la lettura della riattivazione epigenetica. È presente una cassetta di resistenza al G418. Questa classificazione è valida solo in Germania e potrebbe differire in altri paesi.
-------------------	--

Dati biomolecolari

Manipolazione

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM di glutammina stabile, w: 2,0 g/L di NaHCO ₃ (articolo Cytion numero 820700a)
-----------------------	---

Supplements	Integrare il terreno di coltura con il 10% di FBS
--------------------	---

Dissociation Reagent	Accutase
-----------------------------	----------

Doubling time	circa da 24 a 36 ore
----------------------	----------------------

Subculturing	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.
---------------------	---

Split ratio	Da 1 a 5
--------------------	----------

Cellule NCI-H1299-RFP | 300272

Seeding density da 1 a 3×10^4 cellule/cm²

Fluid renewal da 2 a 3 volte alla settimana

Freeze medium Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongellamento, 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.

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO₂, atmosfera umidificata.

Flask Coating Nessuno

Cellule NCI-H1299-RFP | 300272

Freezing Procedure

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.

Shipping Conditions

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.

Storage Conditions

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.

Controllo qualità e analisi molecolare

Sterility

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.

Profilo STR

Amelogenin: x,y

PEZ6: LCLC-97TM1