

NCI-H1299-RFP-cellen | 300272

Algemene informatie

Description

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.

Organism

Mens

Tissue

Long

Disease

Grootcellig carcinoom

Metastatic site

Locatie van de primaire tumor (long)

Applications

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

Kenmerken

Morphology

Epitheelachtig

NCI-H1299-RFP-cellen | 300272

Cell type Epitheelcellen**Growth properties** Aanhangend

Regelgevende gegevens

Citation NCI-H1299-EGFP, met G418-resistentie en een uitgeschakelde reporter (DKFZ # P-1045) (Cytion-catalogusnummer 300272)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_XB25**GMO Status** GMO-S1: Dit derivaat van NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) bevat een stabiel uitgeschakelde EGFP-reporter op de DAPK1-locus, waardoor epigenetische reactivering kan worden gemeten. G418-resistentiecassette aanwezig. Deze classificatie geldt alleen binnen Duitsland en kan elders afwijken.

Biomoleculaire gegevens

Omgaan met

Culture Medium RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiele Glutamine, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (Cytion artikelnummer 820700a)**Supplements** Vul het medium aan met 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** ongeveer 24 tot 36 uur**Subculturing** 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.**Split ratio** 1 tot en met 5

NCI-H1299-RFP-cellen | 300272

Seeding density 1 tot 3×10^4 cellen/cm²

Fluid renewal 2 tot 3 keer per week

Freeze medium Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimeidium (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.

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan -150 °C om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van 37 °C met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij 300 x g om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO₂, bevochtigde atmosfeer.

Flask Coating Geen

NCI-H1299-RFP-cellen | 300272

Freezing Procedure

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.

Shipping Conditions

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.

Storage Conditions

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.

Kwaliteitscontrole en moleculaire analyse

Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.

STR profiel

Amelogenin: x,y
PEZ6: LCLC-97TM1