

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Renseignements généraux

Description

Les cellules RFP NCI-H1299, modifiées pour intégrer un gène rapporteur dans le gène DAPK1, sont non seulement utiles pour étudier l'activation de gènes spécifiques, mais elles permettent également de mieux comprendre, de manière globale, comment les cellules réagissent aux médicaments épigénétiques. En utilisant une technique appelée « analyse CAGE » (Cap Analysis of Gene Expression), les chercheurs ont pu détailler les changements dans les sites de début de transcription à l'échelle du génome en réponse à des traitements par DNMTi (DAC), HDACi (SAHA ou SB939) ou leurs combinaisons. Cette méthode révèle non seulement la réactivation attendue du gène DAPK1, mais aussi l'émergence de nouveaux sites d'initiation de la transcription, appelés TSS non annotés induits par le traitement (TINAT), en particulier sous l'effet d'un traitement médicamenteux. Ces nouveaux sites d'initiation sont généralement situés dans des régions du génome qui ne produisent habituellement pas de protéines et conduisent à la création de nouvelles molécules d'ARN susceptibles de coder pour des protéines.

Une analyse plus approfondie montre que ces nouvelles molécules d'ARN peuvent parfois fusionner avec des molécules existantes pour former ce qu'on appelle des transcrits de fusion TINAT-exon. Selon la manière dont ces transcrits sont épissés, ils peuvent se traduire en nouvelles protéines atypiques. Ce processus a été confirmé par des techniques de laboratoire démontrant que ces transcrits peuvent effectivement mener à la production de nouvelles formes protéiques. Ces protéines pourraient interagir de manière anormale au sein de la cellule ou être reconnues comme étrangères par le système immunitaire, offrant ainsi potentiellement de nouvelles cibles pour le traitement du cancer.

L'activation de ces TINAT implique des changements complexes tant au niveau de la méthylation de l'ADN que des modifications des histones, illustrant une interaction complexe entre ces facteurs épigénétiques sous l'effet d'un traitement médicamenteux. En particulier, l'utilisation combinée du DAC et du SB939 se révèle plus efficace, stimulant l'expression de ces nouveaux transcrits davantage que lorsque l'un ou l'autre de ces médicaments est utilisé seul. La compréhension de ces interactions et de leurs conséquences aide à clarifier comment les thérapies épigénétiques modifient le comportement cellulaire et ouvre la voie à de nouveaux traitements contre le cancer qui tirent parti de ces changements moléculaires complexes.

Organism

Humain

Tissue

Poumon

Disease

Carcinome à grandes cellules

Metastatic site

Site de la tumeur primaire (poumon)

Applications

Recherche en thérapie épigénétique; réactivation du gène DAPK1; études sur la réponse aux médicaments DNMTi et HDACi; sites de début de transcription non annotés induits par le traitement (TINAT); transcriptomique CAGE; analyse des transcrits de fusion; production de protéines atypiques à partir de promoteurs cryptiques; criblage de combinaisons de médicaments épigénétiques

Caractéristiques

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Morphology De type épithélial**Cell type** Cellules épithéliales**Growth properties** Adepté

Données réglementaires

Citation NCI-H1299-EGFP, avec résistance au G418 et gène rapporteur désactivé (DKFZ n° P-1045) (numéro de catalogue Cytion 300272)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_XB25**GMO Status** GMO-S1 : Ce dérivé de la lignée NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) contient un rapporteur EGFP silencieux de manière stable au locus DAPK1, permettant la mesure de la réactivation épigénétique. Cassette de résistance au G418 présente. Cette classification ne s'applique qu'en Allemagne et peut différer ailleurs.

Données biomoléculaires

Manipulation

Culture Medium RPMI 1640, contenant 2,0 mM de glutamine stable et 2,0 g/L de NaHCO_3 (numéro d'article Cytion 820700a)**Supplements** Ajouter 10 % de FBS au milieu de culture**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** environ 24 à 36 heures

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Subculturing Retirez l'ancien milieu des cellules adhérentes et lavez-les avec du PBS sans calcium ni magnésium. Pour les flacons T25, utilisez 3 à 5 ml de PBS, et pour les flacons T75, utilisez 5 à 10 ml. Ensuite, recouvrez complètement les cellules d'Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laissez les cellules incuber à température ambiante pendant 8 à 10 minutes afin de les détacher. Après l'incubation, mélangez délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifugez à 300 x g pendant 3 minutes. Éliminez le surnageant, remettez les cellules en suspension dans du milieu frais, puis transférez-les dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.

Split ratio 1 à 5

Seeding density de 1 à 3×10^4 cellules/cm²

Fluid renewal 2 à 3 fois par semaine

Freeze medium Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (contenant du sérum fœtal bovin) + 10 % de DMSO pour assurer une viabilité adéquate après décongélation, ou du CM-1 (référence Cytion 800100), qui contient des osmoprotecteurs et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryoconservation.

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Thawing and Culturing Cells

1. Assurez-vous que le flacon reste bien congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche afin de maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. À la réception, conservez immédiatement le cryofiole à une température inférieure à -150 °C pour garantir la préservation de l'intégrité cellulaire, ou passez à l'étape 3 si une culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une culture immédiate, décongelez rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à 37 °C contenant de l'eau propre et un agent antimicrobien, en agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit morceau de glace.
4. Effectuez toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire, en désinfectant le cryotube avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrez avec précaution le flacon désinfecté et transférez la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant délicatement.
6. Centrifuger le mélange à 300 x g pendant 3 minutes pour séparer les cellules, puis jeter avec précaution le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre délicatement le culot cellulaire en suspension dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension dans deux flacons de culture T25; pour les cultures en suspension, transférer la totalité du milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance cellulaires efficaces.
8. Respectez les protocoles de sous-culture établis pour assurer la croissance continue et le maintien de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , atmosphère humidifiée.

Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées dans de la glace sèche, dans un emballage isotherme validé contenant suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C pendant tout le transport. À la réception, inspectez immédiatement le conteneur et transférez sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Storage Conditions

Pour une conservation à long terme, placez les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre environ -150 et -196 °C. L'entreposage à -80 °C n'est acceptable qu'à titre d'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Contrôle de la qualité et analyse moléculaire

Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes par luminescence.

Afin de s'assurer qu'il n'y a aucune contamination bactérienne, fongique ou par des levures, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.