

Células NCI-H1299-RFP | 300272**Informações gerais****Description**

As células NCI-H1299 RFP, modificadas para incluir um repórter no gene DAPK1, não só são úteis para estudar a ativação de genes específicos, como também permitem uma compreensão mais ampla da forma como as células reagem globalmente aos fármacos epigenéticos. Utilizando uma técnica chamada Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), os investigadores conseguiram detalhar as alterações no local onde a transcrição começa no genoma em resposta a tratamentos com DNMTi (DAC), HDACi (SAHA ou SB939), ou as suas combinações. Este método revela não só a reativação esperada do gene DAPK1, mas também o aparecimento de novos locais de início da transcrição, denominados TSSs não anotados induzidos pelo tratamento (TINATs), especialmente sob tratamento medicamentoso. Estes novos locais de início estão normalmente localizados em regiões do genoma que não produzem proteínas e conduzem à criação de novas moléculas de ARN que podem potencialmente codificar proteínas.

Uma análise mais aprofundada mostra que estas novas moléculas de ARN podem, por vezes, fundir-se com outras já existentes, formando o que se designa por transcritos de fusão TINAT-exão. Dependendo da forma como estas transcrições são emendadas, podem traduzir-se em novas proteínas atípicas. Este processo foi confirmado através de técnicas laboratoriais que demonstram que estas transcrições podem efetivamente levar à produção de novas formas proteicas. Estas proteínas podem interagir de forma anormal no interior da célula ou ser reconhecidas como estranhas pelo sistema imunitário, oferecendo potencialmente novos alvos para a terapia do cancro.

A ativação destes TINATs envolve alterações intrincadas tanto na metilação do ADN como nas modificações das histonas, ilustrando uma interação complexa entre estes factores epigenéticos sob tratamento medicamentoso. Em particular, o uso combinado de DAC e SB939 mostra um efeito maior, aumentando a expressão desses novos transcritos mais do que quando qualquer um dos medicamentos é usado sozinho. A compreensão destas interações e dos seus resultados ajuda a clarificar a forma como as terapias epigenéticas alteram o comportamento das células e abre possibilidades para novos tratamentos contra o cancro que potenciem estas complexas alterações moleculares.

Organism

Humano

Tissue

Pulmão

Disease

Carcinoma de células grandes

Metastatic site

Localização do tumor primário (pulmão)

Applications

Investigação em terapia epigenética; reativação do gene DAPK1; estudos sobre a resposta a fármacos DNMTi e HDACi; TSS não anotados induzidos pelo tratamento (TINATs); transcriptómica CAGE; análise de transcritos de fusão; produção de proteínas atípicas a partir de promotores crípticos; triagem de combinações de fármacos epigenéticos

Caraterísticas**Morphology**

De tipo epitelial

Células NCI-H1299-RFP | 300272**Cell type** Células epiteliais**Growth properties** Aderente**Dados regulamentares****Citation** NCI-H1299-EGFP, com resistência ao G418 e repórter silenciado (DKFZ n.º P-1045) (número de catálogo Cytion 300272)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_XB25**GMO Status** GMO-S1: Este derivado da linha NCI-H1299 (DKFZ n.º P-1045) contém um repórter EGFP silenciado de forma estável no locus DAPK1, permitindo a leitura da reativação epigenética. Presente cassete de resistência ao G418. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode diferir noutros países.**Dados biomoleculares****Manuseamento****Culture Medium** RPMI 1640, com: 2,0 mM de glutamina estável, com: 2,0 g/L NaHCO₃ (número de artigo Cytion 820700a)**Supplements** Completar o meio com 10% de FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** aprox. 24 a 36 horas**Subculturing** Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.**Split ratio** 1 a 5

Células NCI-H1299-RFP | 300272

Seeding density	1 a 3×10^4 células/cm ²
------------------------	---

Fluid renewal	2 a 3 vezes por semana
----------------------	------------------------

Freeze medium	Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores otimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.
----------------------	---

Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que o frasco permanece profundamente congelado aquando da entrega, uma vez que as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após a receção, armazenar o frasco criogénico imediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantir a preservação da integridade celular, ou avançar para o passo 3 se for necessária uma cultura imediata.
3. Para uma cultura imediata, descongelar rapidamente o frasco imergindo-o num banho de água a 37°C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos até ficar um pequeno aglomerado de gelo.
4. Efetuar todos os passos subsequentes em condições estéreis numa capela de fluxo, desinfetando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfetado e transferir a suspensão de células para um tubo de centrifugação de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando suavemente.
6. Centrifugar a mistura a 300 x g durante 3 minutos para separar as células e eliminar cuidadosamente o sobrenadante que contém o meio de congelação residual.
7. Ressuspender suavemente o pellet de células em 10 ml de meio de cultura fresco. No caso de células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; no caso de culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 para promover uma interação e um crescimento eficazes das células.
8. Cumprir os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento e manutenção contínuos da linha celular, garantindo resultados experimentais fiáveis.

Incubation Atmosphere	37°C, 5% CO ₂ , atmosfera humidificada.
------------------------------	--

Células NCI-H1299-RFP | 300272

Flask Coating Nenhum

Freezing Procedure

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Shipping Conditions

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Storage Conditions

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

Controlo de Qualidade e Análise Molecular

Sterility

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspeções visuais diárias.