

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, mas também proporcionam uma compreensão mais ampla de como as células reagem a medicamentos epigenéticos de maneira global. Por meio de uma técnica chamada Análise de Expressão Gênica por Cap (CAGE), os pesquisadores conseguiram detalhar as mudanças nos locais de início da transcrição em todo o genoma em resposta a tratamentos com DNMTi (DAC), HDACi (SAHA ou SB939) ou suas combinações. Esse método revela não apenas a reativação esperada do gene DAPK1, mas também o surgimento de novos locais de início da transcrição, chamados de TSSs não anotados induzidos por tratamento (TINATs), especialmente sob tratamento com medicamentos. Esses novos locais de início estão tipicamente localizados em regiões do genoma que normalmente não produzem proteínas e levam à criação de novas moléculas de RNA que poderiam, potencialmente, codificar proteínas.

Análises adicionais mostram que essas novas moléculas de RNA podem, às vezes, se fundir com as já existentes para formar o que é conhecido como transcritos de fusão TINAT-exon. Dependendo de como esses transcritos são empalmeados, eles podem ser traduzidos em novas proteínas atípicas. Esse processo foi confirmado por meio de técnicas laboratoriais que demonstram que esses transcritos podem, de fato, levar à produção de novas formas de proteínas. Essas proteínas podem interagir de maneira anormal dentro da célula ou ser reconhecidas como estranhas pelo sistema imunológico, oferecendo potencialmente novos alvos para a terapia do câncer.

A ativação desses TINATs envolve mudanças complexas tanto na metilação do DNA quanto nas modificações das histonas, ilustrando uma interação complexa entre esses fatores 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 isoladamente. Compreender essas interações e seus resultados ajuda a esclarecer como as terapias epigenéticas alteram o comportamento celular e abre possibilidades para novos tratamentos contra o câncer que aproveitem essas complexas alterações moleculares.

Organism

Humano

Tissue

Pulmão

Disease

Carcinoma de células grandes

Metastatic site

Localização do tumor primário (pulmão)

Applications

Pesquisa em terapia epigenética; reativação do gene DAPK1; estudos sobre a resposta a medicamentos DNMTi e HDACi; TSSs não anotados induzidos por tratamento (TINATs); transcriptômica CAGE; análise de transcritos de fusão; produção de proteínas atípicas a partir de promotores crípticos; triagem de combinações de medicamentos epigenéticos

Características**Morphology**

De tipo epitelial

Células NCI-H1299-RFP | 300272**Cell type** Células epiteliais**Growth properties** Aderente**Dados regulatórios****Citation** NCI-H1299-EGFP, com resistência ao G418 e repórter silenciado (DKFZ n.º P-1045) (número de catálogo da Cytion 300272)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_XB25**GMO Status** GMO-S1: Este derivado da linha NCI-H1299 (DKFZ #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 se aplica apenas na Alemanha e pode diferir em outros países.**Dados biomoleculares****Manuseio****Culture Medium** RPMI 1640, com 2,0 mM de glutamina estável e 2,0 g/L de NaHCO₃ (número de artigo da Cytion: 820700a)**Supplements** Adicione 10% de FBS ao meio**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** aproximadamente 24 a 36 horas**Subculturing** Remova o meio antigo das células aderentes e lave-as com PBS sem cálcio nem magnésio. Para frascos T25, use 3 a 5 ml de PBS; para frascos T75, use 5 a 10 ml. Em seguida, cubra as células completamente com Accutase, utilizando 1 a 2 ml para frascos T25 e 2,5 ml para frascos T75. Deixe as células incubarem à temperatura ambiente por 8 a 10 minutos para que se desprendam. Após a incubação, misture delicadamente as células com 10 ml de meio para ressuspender, depois centrifugue a 300xg por 3 minutos. Descarte o sobrenadante, ressuspenda as células em meio fresco e transfira-as 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 meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% de DMSO para garantir viabilidade adequada após o descongelamento, ou CM-1 (número de catálogo da Cytion 800100), que inclui osmoprotetores e estabilizadores metabólicos otimizados para melhorar a recuperação e reduzir o estresse induzido pela criopreservação.
----------------------	--

Thawing and Culturing Cells

1. Verifique se o frasco permanece profundamente congelado no momento da entrega, pois as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após o recebimento, armazene o criovial imediatamente a temperaturas abaixo de -150 °C para garantir a preservação da integridade celular ou prossiga para a etapa 3, caso seja necessária a cultura imediata.
3. Para cultura imediata, descongele rapidamente o frasco imergindo-o em um banho-maria a 37 °C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente por 40 a 60 segundos até que reste apenas um pequeno pedaço de gelo.
4. Realize todas as etapas subsequentes em condições estéreis em uma cabine de fluxo, desinfetando o criovial com etanol a 70% antes de abri-lo.
5. Abra cuidadosamente o frasco desinfetado e transfira a suspensão celular para um tubo de centrifuga de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando delicadamente.
6. Centrifugue a mistura a 300 x g por 3 minutos para separar as células e descarte cuidadosamente o sobrenadante contendo o meio de congelamento residual.
7. Ressuspender suavemente o sedimento celular em 10 ml de meio de cultura fresco. Para células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; para culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 a fim de promover a interação e o crescimento celular eficazes.
8. Siga os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento contínuo e a manutenção da linhagem celular, garantindo resultados experimentais confiáveis.

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

Células NCI-H1299-RFP | 300272

Shipping Conditions

As linhagens celulares criopreservadas são enviadas em gelo seco, em embalagens isoladas e validadas, com refrigerante suficiente para manter a temperatura em aproximadamente -78°C durante todo o transporte. Ao receber a remessa, inspecione o recipiente imediatamente e transfira os frascos sem demora para o local de armazenamento adequado.

Storage Conditions

Para preservação a longo prazo, coloque os frascos em nitrogênio líquido em fase de vapor a uma temperatura entre aproximadamente -150 e -196°C . O armazenamento a -80°C é aceitável apenas como uma etapa intermediária de curta duração antes da transferência para o nitrogênio líquido.

Controle de Qualidade e Análise Molecular

Sterility

A contaminação por micoplasma é descartada por meio de ensaios baseados em PCR e de métodos de detecção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não haja contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, as culturas celulares são submetidas a inspeções visuais diárias.