Células NCI-H1299-RFP

300272

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.

GENERAL INFORMATION

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.

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

CLASSIFICATION

Organism	Human
Growth properties	Adherent
GMO status	GMO-S1

GMO status details

GMO-S1: This NCI-H1299 derivative (DKFZ #P-1045) contains a stably silenced EGFP reporter in the DAPK1 locus enabling epigenetic reactivation readout. G418-resistance cassette present. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Biosafety level	1

CHARACTERISTICS

Morphology	De tipo epitelial
Cell type	Células epiteliais
Doubling time	aproximadamente 24 a 36 horas

IDENTIFIERS

Citation

NCI-H1299-EGFP, com resistência ao G418 e repórter silenciado (DKFZ n.º P-1045) (número de catálogo da Cytion 300272)

NCBI TaxID	9606
Cellosaurus	CVCL_XB25

HANDLING AND CULTURE

Culture medium

RPMI 1640, com 2,0 mM de glutamina estável e 2,0 g/L de $NaHCO_3$ (número de artigo da Cytion: 820700a)

Incubation atmosphere	37 °C, 5% de CO_2, atmosfera umidificada.

Supplements

Adicione 10% de FBS ao meio

Dissociation reagent	Accutase

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
Seeding density	1 a 3 × 10^4 células/cm^2
Fluid renewal	2 a 3 vezes por semana

Thawing and culturing

Confirm that the vial remains deeply frozen upon delivery, as cells are shipped on dry ice to maintain optimal temperatures during transit.
Upon receipt, either store the cryovial immediately at temperatures below -150°C to ensure the preservation of cellular integrity, or proceed to step 3 if immediate culturing is required.
For immediate culturing, swiftly thaw the vial by immersing it in a 37°C water bath with clean water and an antimicrobial agent, agitating gently for 40-60 seconds until a small ice clump remains.
Perform all subsequent steps under sterile conditions in a flow hood, disinfecting the cryovial with 70% ethanol before opening.
Carefully open the disinfected vial and transfer the cell suspension into a 15 ml centrifuge tube containing 8 ml of room-temperature culture medium, mixing gently.
Centrifuge the mixture at 300 x g for 3 minutes to separate the cells and carefully discard the supernatant containing residual freezing medium.
Gently resuspend the cell pellet in 10 ml of fresh culture medium. For adherent cells, divide the suspension between two T25 culture flasks; for suspension cultures, transfer all the medium into one T25 flask to promote effective cell interaction and growth.
Adhere to established subculture protocols for continued growth and maintenance of the cell line, ensuring reliable experimental outcomes.

QUALITY CONTROL AND CRYOPRESERVATION

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.

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.

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.

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.

LEGAL AND SAFETY

Safety precautions

Ao planejar o armazenamento de um criotubo em nitrogênio líquido para descongelamento futuro, é obrigatório seguir medidas de segurança rigorosas. É essencial o uso de luvas e roupas de proteção adequadas, além do uso obrigatório de máscara facial ou óculos de proteção durante a transferência de amostras congeladas para dentro ou para fora do tanque de nitrogênio líquido. Isso visa mitigar o risco de ferimentos decorrentes de possíveis explosões dos criotubos durante a remoção, o que pode resultar na projeção de fragmentos pontiagudos.

Warranty

Na Cytion, garantimos a qualidade e a viabilidade de nossos produtos.
Garantimos que nossas células permanecerão viáveis no início da cultura por
60 dias após o envio de nossas instalações.
Asseguramos que todos os materiais estão em conformidade com as especificações descritas no
Certificado de Análise e/ou na Ficha Técnica do Produto.
Para obter todos os detalhes, consulte nossa
Declaração de Garantia.

Third-party agreements apply	Yes