

Células NCI-H1299-RFP | 300272**Información general****Description**

Las células NCI-H1299 RFP, modificadas para incluir un reportero en el gen DAPK1, no solo son útiles para estudiar la activación de genes específicos, sino que también permiten comprender mejor cómo reaccionan las células a los fármacos epigenéticos en general. Mediante el uso de una técnica llamada Análisis de la Expresión Génica por Cap (CAGE), los investigadores han podido detallar los cambios en los puntos de inicio de la transcripción a lo largo del genoma en respuesta a tratamientos con DNMTi (DAC), HDACi (SAHA o SB939) o sus combinaciones. Este método revela no solo la reactivación esperada del gen DAPK1, sino también la aparición de nuevos sitios de inicio de transcripción, denominados TSS no anotados inducidos por el tratamiento (TINAT), especialmente bajo tratamiento farmacológico. Estos nuevos sitios de inicio suelen ubicarse en regiones del genoma que normalmente no producen proteínas y dan lugar a la creación de nuevas moléculas de ARN que podrían codificar proteínas.

Un análisis más detallado muestra que estas nuevas moléculas de ARN a veces pueden fusionarse con las ya existentes para formar lo que se conoce como transcritos de fusión TINAT-exón. Dependiendo de cómo se empalmen estos transcritos, pueden traducirse en proteínas nuevas y atípicas. Este proceso se ha confirmado mediante técnicas de laboratorio que demuestran que estos transcritos pueden, de hecho, dar lugar a la producción de nuevas formas de proteínas. Estas proteínas podrían interactuar de manera anómala dentro de la célula o ser reconocidas como extrañas por el sistema inmunológico, lo que podría ofrecer nuevas dianas para la terapia contra el cáncer.

La activación de estos TINAT implica cambios intrincados tanto en la metilación del ADN como en las modificaciones de las histonas, lo que ilustra una interacción compleja entre estos factores epigenéticos bajo tratamiento farmacológico. En particular, el uso combinado de DAC y SB939 muestra un mayor efecto, potenciando la expresión de estos nuevos transcritos más que cuando se utiliza cualquiera de los fármacos por sí solo. Comprender estas interacciones y sus resultados ayuda a aclarar cómo las terapias epigenéticas alteran el comportamiento celular y abre posibilidades para nuevos tratamientos contra el cáncer que aprovechen estos complejos cambios moleculares.

Organism

Humano

Tissue

Pulmón

Disease

Carcinoma de células grandes

Metastatic site

Localización del tumor primario (pulmón)

Applications

Investigación en terapia epigenética; reactivación del gen DAPK1; estudios sobre la respuesta a fármacos DNMTi e HDACi; sitios de inicio de transcripción no anotados inducidos por el tratamiento (TINAT); transcriptómica CAGE; análisis de transcritos de fusión; producción de proteínas atípicas a partir de promotores crípticos; cribado de combinaciones de fármacos epigenéticos

Características**Morphology**

De tipo epitelial

Células NCI-H1299-RFP | 300272**Cell type** Células epiteliales**Growth properties** Adherente**Datos normativos****Citation** NCI-H1299-EGFP, con resistencia al G418 y reportero silenciado (DKFZ n.º P-1045) (número de catálogo de Cytion 300272)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_XB25**GMO Status** GMO-S1: Este derivado de NCI-H1299 (DKFZ n.º P-1045) contiene un reportero EGFP silenciado de manera estable en el locus DAPK1, lo que permite la lectura de la reactivación epigenética. Presenta un casete de resistencia al G418. Esta clasificación se aplica únicamente en Alemania y puede variar en otros lugares.**Datos biomoleculares****Manejo****Culture Medium** RPMI 1640, con 2,0 mM de glutamina estable y 2,0 g/L de NaHCO₃ (número de artículo de Cytion: 820700a)**Supplements** Añade al medio un 10 % de FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** aprox. de 24 a 36 horas**Subculturing** Retira el medio usado de las células adheridas y lávalas con PBS sin calcio ni magnesio. Para los frascos T25, usa de 3 a 5 ml de PBS, y para los frascos T75, usa de 5 a 10 ml. Luego, cubra las células por completo con Accutase, utilizando de 1 a 2 ml para los frascos T25 y 2,5 ml para los frascos T75. Deje que las células se incuben a temperatura ambiente durante 8 a 10 minutos para desprenderse. Después de la incubación, mezcla suavemente las células con 10 ml de medio para resuspenderlas; luego, centrifuga a 300xg durante 3 minutos. Deseche el sobrenadante, resuspenda las células en medio fresco y transfíralas a frascos nuevos que ya contengan medio fresco.

Células NCI-H1299-RFP | 300272**Split ratio** Del 1 al 5**Seeding density** De 1 a 3×10^4 células/cm²**Fluid renewal** De 2 a 3 veces por semana**Freeze medium** Como medio de criopreservación, utilizamos un medio de crecimiento completo (que incluye FBS) + 10 % de DMSO para garantizar una viabilidad adecuada tras la descongelación, o CM-1 (número de catálogo de Cytion 800100), que incluye osmoprotectores y estabilizadores metabólicos optimizados para mejorar la recuperación y reducir el estrés inducido por la criopreservación.**Thawing and Culturing Cells**

1. Verifique que el vial se mantenga profundamente congelado al momento de la entrega, ya que las células se envían en hielo seco para mantener temperaturas óptimas durante el transporte.
2. Al recibirlo, almacene el criovial inmediatamente a temperaturas inferiores a -150 °C para garantizar la preservación de la integridad celular, o bien continúe con el paso 3 si se requiere un cultivo inmediato.
3. Para el cultivo inmediato, descongele rápidamente el vial sumergiéndolo en un baño de agua a 37 °C con agua limpia y un agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40 a 60 segundos hasta que quede un pequeño trozo de hielo.
4. Realice todos los pasos posteriores en condiciones estériles bajo una cabina de flujo laminar, desinfectando el criovial con etanol al 70 % antes de abrirlo.
5. Abra con cuidado el vial desinfectado y transfiera la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenga 8 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente, mezclando suavemente.
6. Centrifugue la mezcla a 300 x g durante 3 minutos para separar las células y deseche con cuidado el sobrenadante que contenga medio de congelación residual.
7. Resuspende suavemente el sedimento celular en 10 ml de medio de cultivo fresco. Para las células adherentes, divide la suspensión entre dos frascos de cultivo T25; para los cultivos en suspensión, transfiere todo el medio a un solo frasco T25 para promover una interacción y un crecimiento celular efectivos.
8. Siga los protocolos de subcultivo establecidos para el crecimiento y mantenimiento continuos de la línea celular, asegurando resultados experimentales confiables.

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 % de CO₂, atmósfera humidificada.

Células NCI-H1299-RFP | 300272

Shipping Conditions

Las líneas celulares criopreservadas se envían en hielo seco, en un embalaje aislante validado que contiene suficiente refrigerante para mantener una temperatura de aproximadamente -78°C durante todo el transporte. Al recibir el envío, revise el contenedor de inmediato y traslade los viales sin demora al lugar de almacenamiento adecuado.

Storage Conditions

Para la conservación a largo plazo, coloque los viales en nitrógeno líquido en fase de vapor a una temperatura de entre -150 y -196°C , aproximadamente. El almacenamiento a -80°C solo es aceptable como un paso intermedio breve antes de transferirlos al nitrógeno líquido.

Control de calidad y análisis molecular

Sterility

Se descarta la contaminación por micoplasmas mediante ensayos basados en PCR y métodos de detección de micoplasmas basados en luminiscencia.

Para garantizar que no haya contaminación bacteriana, fúngica o por levaduras, los cultivos celulares se someten a inspecciones visuales diarias.