

**Buňky HaCaT-ras A5 | 300494****Obecné informace****Description**

Buňky HaCaT-ras A5 jsou spontánně immortalizovaná, nenádorová linie lidských kožních keratinocytů, která je důležitá pro studium interakcí mezi nádorovým mikroprostředím a progresí kožního karcinomu. Tyto buňky, pocházející od 62letého muže kavkazského původu, prošly klonální selekcí a mutagenezí, což spolu s autokrinní regulací růstových faktorů umožňuje tvorbu pomalu rostoucích, vysoce diferencovaných benigních cystických nádorů u myši Balb/c-nu/nu. To z nich činí cenný model pro zkoumání buněčné dynamiky a molekulárních mechanismů progresu nádorů in vivo.

Buňky HaCaT-ras A5 jsou zvláště užitečné pro objasnění komplexních interakcí mezi nádorovými buňkami a okolními stromálními buňkami, včetně fibroblastů, imunitních buněk a endoteliálních buněk. Tyto interakce jsou zprostředkovány sekrecí různých signálních molekul, jako jsou růstové faktory, cytokiny a proteázy, mezi nimiž hraje klíčovou roli interleukin-6 (IL-6). Je známo, že u mnoha typů rakoviny dochází k dysregulaci IL-6, především prostřednictvím nadměrné exprese nebo trvalé aktivace transkripčního faktoru STAT3.

Výzkum ukázal, že stimulace buněk HaCaT-ras A5 pomocí IL-6 významně zvyšuje jejich proliferaci prostřednictvím signální dráhy JAK/STAT, zatímco fibroblasty zůstávají neovlivněny díky silnější inhibici SOCS3, negativním regulátorem této dráhy. Tato rozdílná odezva byla zachycena v matematickém modelu popisujícím dynamiku STAT3 a SOCS3, což umožňuje hlubší pochopení buněčně specifických signalizačních kaskád.

Kromě toho IL-6 nejen přímo ovlivňuje proliferaci buněk HaCaT-ras A5, ale také nepřímo ovlivňuje buněčné prostředí prostřednictvím aktivace sítě růstových faktorů, jako jsou HGF, KGF, VEGF a IL-8. Analýza genové exprese zahrnující více než 16 000 genů odhalila, že stimulace IL-6 zvyšuje regulaci 19 genů souvisejících s interferonovou signální dráhou jak u buněk HaCaT-ras A5, tak u fibroblastů, což koreluje s pozorovanou inhibicí růstu u fibroblastů.

Objev klíčové role SerpinB4 v proliferaci buněk HaCaT-ras A5, potvrzený pomocí experimentů s knockdown siRNA, podtrhuje složitou regulaci IL-6 jak v nádorových, tak ve stromálních buňkách. Toto komplexní pochopení rolí IL-6 zvyšuje potenciál pro vývoj cílených terapeutických strategií zaměřených na modulaci signálních drah IL-6 v nádorovém mikroprostředí.

Celkově lze říci, že buňky HaCaT-ras A5 představují robustní model pro zkoumání komplexní interakce v nádorovém mikroprostředí, což otevírá cestu k novým přístupům ve výzkumu a vývoji terapie rakoviny.

**Organism** Člověk**Tissue** Kůže**Synonyms** HaCaT-ras klon A-5, HaCaT A-5, A-5, A5**Charakteristika****Age** 62 let**Gender** Muži

**Buňky HaCaT-ras A5 | 300494****Ethnicity** Kavkazský**Cell type** Keratinocyty**Growth properties** Adherentní**Regulační údaje****Citation** HaCaT-ras A5 (katalogové číslo Cytion 300494)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_xK16**Depositor** DKFZ, Heidelberg**GMO Status** GMO-S1: Tato linie HaCaT-ras A5 obsahuje plazmidový konstrukt onkogenu c-Ha-ras pro výzkum epiteliální transformace. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.**Biomolekulární data****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Tvorba benigních nádorů u myší Balb/c-nu/nu.**Karyotype** Aneuploidní (hypotetraploidní)**Zpracování****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutaminu, w: 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)**Supplements** Doplňte médium o 10% FBS

**Buňky HaCaT-ras A5 | 300494****Dissociation Reagent**

Směs EDTA (zásoba 0,05 %) a trypsinu (zásoba 0,1 %) v poměru 1:1 musí být připravena vždy před oddělením buněk pomocí PBS bez Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>, aby byla zajištěna fyziologická osmolarita. Směsi trypsinu/EDTA připravené k použití se nedoporučují, protože mohou způsobit shlukování buněk. Jako alternativu lze místo trypsinu/EDTA použít TrypLETM Express (Life Technologies). Je třeba dodržovat protokol výrobce.

**Subculturing**

1. **Vyřazení starého média:** Odstraňte staré médium z baněk.
2. **Promývání buněk:** Přidejte 3-5 ml PBS (bez vápníku a hořčíku) do baněk T25 nebo 5-10 ml do baněk T75, abyste promyli adheující buňky.
3. **Přidejte roztok EDTA:** Vrstvu buněk zcela pokryjte čerstvě připraveným 0,05% roztokem EDTA - použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75.
4. **Inkubace:** Inkubujte buňky při teplotě 37 °C po dobu 10 minut.
5. **Přidejte roztok trypsinu/EDTA:** Po inkubaci přidejte do baněk čerstvě připravený roztok trypsinu/EDTA (0,05% trypsin, 0,025% EDTA) a zajistěte, aby byly buňky zcela pokryty - použijte 1 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75.
6. **Monitorujte oddělování:** Pozorujte buňky, které by se měly oddělit během 1-2 minut.
7. **Neutralizujte trypsin:** Přidejte buněčné kultivační médium obsahující FBS, abyste zastavili trypsinovou aktivitu.
8. **Přeneste buňky:** Dávkujte buněčnou suspenzi do nových baněk předem naplněných čerstvým kultivačním médiem.

**Split ratio**

Doporučuje se poměr 1:5 až 1:10

**Seeding density**

1 x 10<sup>4</sup> buněk/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal**

2krát týdně

**Freeze medium**

Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

**Buňky HaCaT-ras A5 | 300494****Thawing and  
Culturing Cells**

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstřeďte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

**Incubation  
Atmosphere**

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , zvlhčená atmosféra.

**Flask Coating**

Žádný

**Freezing  
Procedure**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

**Shipping  
Conditions**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

**Buňky HaCaT-ras A5 | 300494****Storage  
Conditions**

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

**Kontrola kvality / Genetický profil / HLA****Sterility**

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuální kontrolám.

**Profil STR**

**Amelogenin:** x,x  
**CSF1PO:** 9,11  
**D13S317:** 10,12  
**D16S539:** 9,12  
**D5S818:** 12  
**D7S820:** 9,11  
**TH01:** 9.3  
**TPOX:** 11,12  
**vWA:** 16,17  
**D3S1358:** 16  
**D21S11:** 28,30.2  
**D18S51:** 12  
**Penta E:** 7,12  
**Penta D:** 11,13  
**D8S1179:** 14  
**FGA:** 24

**Alely HLA**

**A\*:** '31:01:02  
**B\*:** '40:01:02, '51:01:01  
**C\*:** '03:04:01, '15:02:01  
**DRB1\*:** '04:01:01, '15:01:01G  
**DQA1\*:** '01:02:01, '03:03:01  
**DQB1\*:** '03:01:01, '06:02:01  
**DPB1\*:** '03:01:01G, '04:01:01G  
**E:** '01:03:01, '01:03:02