

HaCaT-ras A5-celler | 300494**Generel information****Description**

HaCaT-ras A5-celler er en spontant udødeliggjort, ikke-tumorigen menneskelig hudkeratinocytcellelinje, der er afgørende for studiet af interaktioner i tumormikromiljøet og udviklingen af hudkarcinom. Disse celler stammer fra en 62-årig kaukasisk mand og har gennemgået klonal selektion og mutagenese, som sammen med autokrin vækstfaktorregulering muliggør dannelsen af langsomt voksende, højt differentierede godartede cystiske tumorer i Balb/c-nu/nu-mus. Det gør dem til en værdifuld model til undersøgelse af den cellulære dynamik og de molekylære mekanismer i tumorprogression in vivo.

HaCaT-ras A5-cellerne er særligt nyttige til at belyse de komplekse interaktioner mellem tumorceller og de omgivende stromaceller, herunder fibroblaster, immunceller og endotelceller. Disse interaktioner medieres af udskillelsen af forskellige signalmolekyler som vækstfaktorer, cytokiner og proteaser, hvoraf interleukin-6 (IL-6) spiller en central rolle. Det er kendt, at IL-6 bliver dysreguleret i mange kræfttyper, primært gennem overekspression eller vedvarende aktivering af transkriptionsfaktoren STAT3.

Forskning har vist, at IL-6-stimulering af HaCaT-ras A5-celler øger deres proliferation betydeligt via JAK/STAT-signalvejen, mens fibroblaster forbliver upåvirkede på grund af en mere potent hæmning af SOCS3, en negativ regulator af denne vej. Denne differentierede respons er blevet indfanget i en matematisk model, der beskriver dynamikken i STAT3 og SOCS3, hvilket giver en dybere forståelse af celledifferensierede signalkaskader.

Desuden påvirker IL-6 ikke kun direkte HaCaT-ras A5-celleproliferation, men påvirker også indirekte det cellulære miljø gennem aktivering af et netværk af vækstfaktorer som HGF, KGF, VEGF og IL-8. Genekspressionsanalyse med over 16.000 gener afslørede, at IL-6-stimulering opregulerer 19 gener relateret til interferonsignalvejen i både HaCaT-ras A5-celler og fibroblaster, hvilket korrelerer med den observerede væksthæmning i fibroblaster.

Opdagelsen af SerpinB4's afgørende rolle i spredningen af HaCaT-ras A5-celler, bekræftet gennem siRNA-knockdown-eksperimenter, understreger den indviklede regulering af IL-6 i både tumor- og stromaceller. Denne omfattende forståelse af IL-6's roller øger potentialet for at udvikle målrettede terapeutiske strategier, der sigter mod at modulere IL-6-signalveje i tumormikromiljøet.

Alt i alt er HaCaT-ras A5-celler en robust model til at udforske det komplekse samspil i tumormikromiljøet, hvilket baner vejen for nye tilgange til kræftforskning og terapiudvikling.

Organism Menneske

Tissue Hud

Synonyms HaCaT-ras klon A-5, HaCaT A-5, A-5, A5

Karakteristika

Age 62 år

Gender Mand

HaCaT-ras A5-celler | 300494**Ethnicity** Kaukasisk**Cell type** Keratinocyt**Growth properties** Vedhæftende**Regulatoriske data****Citation** HaCaT-ras A5 (Cytion katalognummer 300494)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_xK16**GMO Status** GMO-S1: Denne HaCaT-ras A5-linje indeholder en plasmidbåren c-Ha-ras onkogenkonstruktion til forskning i epitelial transformation. Denne klassificering gælder kun i Tyskland og kan variere andre steder.**Biomolekylære data****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Dannelse af godartede tumorer i Balb/c-nu/nu-mus.**Karyotype** Aneuploid (hypotetraploid)**Håndtering****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glukose, w: 4 mM L-glutamin, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM natriumpyruvat (Cytion artikelnummer 820300a)**Supplements** Suppler mediet med 10% FBS**Dissociation Reagent** 1:1-blandingen af EDTA (lager: 0,05 %) og trypsin (lager: 0,1 %) skal tilberedes hver gang, inden cellerne løsnes, ved hjælp af PBS uden Ca²⁺ og Mg²⁺ for at opnå en fysiologisk osmolaritet. Brugsklare blandinger af trypsin/EDTA anbefales ikke, da det kan resultere i celleklumper. Som alternativ kan TrypLETM Express (Life Technologies) anvendes i stedet for trypsin/EDTA. Producentens protokol skal følges.

HaCaT-ras A5-celler | 300494

Subculturing

1. **Kassér det gamle medium:** Fjern det gamle medium fra kolberne.
2. **Vask cellerne:** Tilsæt 3-5 ml PBS (uden calcium og magnesium) til T25-kolberne eller 5-10 ml til T75-kolberne for at vaske de klæbende celler.
3. **Tilsæt EDTA-opløsning:** Dæk cellelaget helt med en frisklavet 0,05 % EDTA-opløsning - brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber.
4. **Inkubation:** Inkuber kolberne ved 37 grader Celsius i 10 minutter.
5. **Tilsæt trypsin/EDTA-opløsning:** Efter inkubationen tilsættes en frisklavet trypsin/EDTA-opløsning (0,05 % trypsin, 0,025 % EDTA) til kolberne, og det sikres, at cellerne er helt dækket - brug 1 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber.
6. **Overvåg løsrivelsen:** Hold øje med cellerne, som bør løsne sig inden for 1-2 minutter.
7. **Neutraliser trypsin:** Tilsæt FBS-holdigt cellekulturmedium for at stoppe trypsinaktiviteten.
8. **Overfør celler:** Fordel cellesuspensionen i nye kolber, der er fyldt med frisk dyrkningsmedium.

Seeding density 1×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 gange om ugen

Freeze medium Som kryopræservationsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

HaCaT-ras A5-celler | 300494

Thawing and Culturing Cells

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befugtet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Shipping Conditions

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

HaCaT-ras A5-celler | 300494

Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Kvalitetskontrol / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.

HLA-alleler

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