

HaCaT-ras A5-Zellen | 300494

Allgemeine Informationen

Description

HaCaT-ras A5-Zellen sind eine spontan immortalisierte, nicht-tumorigene humane Hautkeratinozyten-Zelllinie, die für die Untersuchung der Interaktionen zwischen Tumormikroumgebung und dem Fortschreiten des Hautkarzinoms von Bedeutung ist. Diese von einem 62-jährigen kaukasischen Mann stammenden Zellen wurden einer klonalen Selektion und Mutagenese unterzogen, die in Verbindung mit einer autokrinen Wachstumsfaktorregulierung die Bildung langsam wachsender, hoch differenzierter gutartiger zystischer Tumore in Balb/c-nu/nu-Mäusen ermöglichen. Dies macht sie zu einem wertvollen Modell für die Erforschung der zellulären Dynamik und der molekularen Mechanismen der Tumorprogression in vivo.

Die HaCaT-ras A5-Zellen sind besonders geeignet, um die komplexen Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und umgebenden Stromazellen, einschließlich Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen, aufzuklären. Diese Interaktionen werden durch die Sekretion verschiedener Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen vermittelt, von denen Interleukin-6 (IL-6) eine zentrale Rolle spielt. Es ist bekannt, dass IL-6 bei vielen Krebsarten dysreguliert wird, vor allem durch Überexpression oder anhaltende Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3.

Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass die Stimulierung von HaCaT-ras A5-Zellen durch IL-6 deren Proliferation über den JAK/STAT-Signalweg signifikant erhöht, während Fibroblasten aufgrund einer stärkeren Hemmung durch SOCS3, einem negativen Regulator dieses Signalwegs, unbeeinflusst bleiben. Diese unterschiedliche Reaktion wurde in einem mathematischen Modell erfasst, das die Dynamik von STAT3 und SOCS3 beschreibt und ein tieferes Verständnis der zellspezifischen Signalkaskaden ermöglicht.

Darüber hinaus wirkt sich IL-6 nicht nur direkt auf die Proliferation von HaCaT-ras A5-Zellen aus, sondern beeinflusst auch indirekt die zelluläre Umgebung durch die Aktivierung eines Netzwerks von Wachstumsfaktoren wie HGF, KGF, VEGF und IL-8. Eine Genexpressionsanalyse mit über 16.000 Genen ergab, dass die IL-6-Stimulation 19 Gene hochreguliert, die mit dem Interferon-Signalweg sowohl in HaCaT-ras A5-Zellen als auch in Fibroblasten in Verbindung stehen, was mit der beobachteten Wachstumshemmung in Fibroblasten korreliert.

Die Entdeckung der entscheidenden Rolle von SerpinB4 bei der Proliferation von HaCaT-ras A5-Zellen, die durch siRNA-Knockdown-Experimente bestätigt wurde, unterstreicht die komplizierte Regulierung durch IL-6 sowohl in Tumor- als auch in Stromazellen. Dieses umfassende Verständnis der Rolle von IL-6 erhöht das Potenzial für die Entwicklung gezielter therapeutischer Strategien, die darauf abzielen, die IL-6-Signalwege in der Mikroumgebung des Tumors zu modulieren.

Insgesamt bieten HaCaT-ras A5-Zellen ein robustes Modell zur Erforschung des komplexen Zusammenspiels innerhalb der Tumormikroumgebung und ebnen den Weg für neue Ansätze in der Krebsforschung und Therapieentwicklung.

Organism Menschen

Tissue Haut

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

Merkmale

HaCaT-ras A5-Zellen | 300494

Age	62 Jahre
Gender	Männlich
Ethnicity	Kaukasisch
Cell type	Keratinocyten
Growth properties	Adhärent

Regulatorische Daten

Citation	HaCaT-ras A5 (Cytion Katalognummer 300494)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_xK16
Depositor	DKFZ, Heidelberg
GMO Status	GVO-S1: Diese HaCaT-ras A5-Linie enthält ein Plasmid-getragenes c-Ha-ras-Onkogenkonstrukt für die Erforschung der epithelialen Transformation. Diese Klassifizierung gilt nur innerhalb Deutschlands und kann in anderen Ländern abweichen.

Biomolekulare Daten

Protein expression	P53 (+), CEA (+),
Tumorigenic	Bildung von gutartigen Tumoren bei Balb/c-nu/nu-Mäusen.
Karyotype	Aneuploid (hypotetraploid)

Handhabung

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L Glucose, w: 4 mM L-Glutamin, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM Natriumpyruvat (Cytion-Artikelnummer 820300a)
-----------------------	---

HaCaT-ras A5-Zellen | 300494

Supplements Ergänzen Sie das Medium mit 10% FBS

Dissociation Reagent Die 1:1-Mischung aus EDTA (Bestand: 0,05 %) und Trypsin (Bestand: 0,1 %) muss jedes Mal vor dem Ablösen der Zellen mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ hergestellt werden, um eine physiologische Osmolarität zu erreichen. Gebrauchsfertige Mischungen von Trypsin/EDTA werden nicht empfohlen, da dies zu Zellklumpen führen kann. Als Alternative kann TrypLETM Express (Life Technologies) anstelle von Trypsin/EDTA verwendet werden. Das Protokoll des Herstellers sollte befolgt werden.

Subculturing

1. **Altes Medium entsorgen:** Entfernen Sie das alte Medium aus den Flaschen.
2. **Zellen waschen:** Geben Sie 3-5 ml PBS (ohne Kalzium und Magnesium) in T25-Kolben oder 5-10 ml in T75-Kolben, um die anhaftenden Zellen zu waschen.
3. **EDTA-Lösung zugeben:** Bedecken Sie die Zellschicht vollständig mit einer frisch zubereiteten 0,05%igen EDTA-Lösung - verwenden Sie 1-2 ml für T25-Kolben und 2,5 ml für T75-Kolben.
4. **Bebrütung:** Bebrüten Sie die Flaschen 10 Minuten lang bei 37 Grad Celsius.
5. **Trypsin/EDTA-Lösung zugeben:** Nach der Inkubation geben Sie eine frisch zubereitete Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,025 % EDTA) in die Flaschen und stellen sicher, dass die Zellen vollständig bedeckt sind - verwenden Sie 1 ml für T25-Kolben und 2,5 ml für T75-Kolben.
6. **Ablösung überwachen:** Beobachten Sie die Zellen, die sich innerhalb von 1-2 Minuten ablösen sollten.
7. **Trypsin neutralisieren:** FBS-haltiges Zellkulturmedium hinzufügen, um die Trypsinaktivität zu stoppen.
8. **Zellen transferieren:** Verteilen Sie die Zellsuspension in neue, mit frischem Kulturmedium gefüllte Flaschen.

Split ratio Empfohlen wird ein Verhältnis von 1:5 bis 1:10

Seeding density 1×10^4 Zellen/cm²

Fluid renewal 2 Mal pro Woche

Freeze medium Als Kryokonservierungsmedium verwenden wir komplettes Wachstumsmedium (einschließlich FBS) + 10 % DMSO für eine angemessene Lebensfähigkeit nach dem Auftauen oder CM-1 (Cytion Katalognummer 800100), das optimierte Osmoprotektoren und Stoffwechselstabilisatoren enthält, um die Erholung zu verbessern und kryoinduzierten Stress zu reduzieren.

HaCaT-ras A5-Zellen | 300494

Thawing and Culturing Cells

1. Vergewissern Sie sich, dass das Fläschchen bei der Lieferung tiefgefroren ist, da die Zellen auf Trockeneis versandt werden, um während des Transports optimale Temperaturen zu erhalten.
2. Lagern Sie das Kryofläschchen nach Erhalt entweder sofort bei Temperaturen unter $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, um die Unversehrtheit der Zellen zu gewährleisten, oder fahren Sie mit Schritt 3 fort, wenn eine sofortige Kultivierung erforderlich ist.
3. Für eine sofortige Kultivierung tauen Sie das Fläschchen schnell auf, indem Sie es in ein 37°C warmes Wasserbad mit sauberem Wasser und einem antimikrobiellen Mittel eintauchen und 40-60 Sekunden lang vorsichtig schütteln, bis ein kleiner Eisklumpen zurückbleibt.
4. Führen Sie alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen in einer Abzugshaube durch und desinfizieren Sie das Kryo-Fläschchen vor dem Öffnen mit 70%igem Ethanol.
5. Das desinfizierte Fläschchen vorsichtig öffnen und die Zellsuspension unter vorsichtigem Mischen in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Kulturmedium bei Raumtemperatur überführen.
6. Zentrifugieren Sie das Gemisch 3 Minuten lang bei $300 \times g$, um die Zellen abzutrennen, und werfen Sie den Überstand mit dem restlichen Gefriermedium vorsichtig.
7. Das Zellpellet vorsichtig in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendieren. Bei adhärenenten Zellen die Suspension auf zwei T25-Kulturflaschen aufteilen; bei Suspensionskulturen das gesamte Medium in eine T25-Flasche überführen, um eine effektive Zellinteraktion und ein effektives Wachstum zu fördern.
8. Halten Sie sich an die festgelegten Subkulturprotokolle, um ein kontinuierliches Wachstum und die Aufrechterhaltung der Zelllinie zu gewährleisten und zuverlässige Versuchsergebnisse zu erzielen.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , befeuchtete Atmosphäre.

Flask Coating

Keine

Freezing Procedure

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

HaCaT-ras A5-Zellen | 300494

Shipping Conditions

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa -78 °C aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

Storage Conditions

Zur Langzeitkonservierung werden die Fläschchen in flüssigem Stickstoff bei etwa -150 bis -196 °C gelagert. Eine Lagerung bei -80 °C ist nur als kurzer Zwischenschritt vor der Überführung in flüssigen Stickstoff akzeptabel.

Qualitätskontrolle / Genetisches Profil / HLA

Sterility

Eine Kontamination mit Mykoplasmen wird sowohl durch PCR-basierte Assays als auch durch lumineszenzbasierte Mykoplasmen-Nachweisverfahren ausgeschlossen.

Um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Hefen vorliegt, werden die Zellkulturen täglich visuell überprüft.

STR-Profil

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

HLA-Allele

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