

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494**Informations générales****Description**

Les cellules HaCaT-ras A5 sont une lignée cellulaire de kératinocytes de la peau humaine spontanément immortalisée et non tumorigène, qui joue un rôle essentiel dans l'étude des interactions entre le microenvironnement tumoral et la progression du carcinome cutané. Provenant d'un homme caucasien de 62 ans, ces cellules ont fait l'objet d'une sélection clonale et d'une mutagénèse qui, associées à une régulation autocrine des facteurs de croissance, permettent la formation de tumeurs kystiques bénignes à croissance lente et hautement différenciées chez les souris Balb/c-nu/nu. Cela en fait un modèle précieux pour l'étude de la dynamique cellulaire et des mécanismes moléculaires de la progression tumorale in vivo.

Les cellules HaCaT-ras A5 sont particulièrement utiles pour élucider les interactions complexes entre les cellules tumorales et les cellules stromales environnantes, y compris les fibroblastes, les cellules immunitaires et les cellules endothéliales. Ces interactions sont médiées par la sécrétion de diverses molécules de signalisation telles que les facteurs de croissance, les cytokines et les protéases, parmi lesquelles l'interleukine-6 (IL-6) joue un rôle central. On sait que l'IL-6 est dérégulée dans de nombreux types de cancer, principalement par la surexpression ou l'activation persistante du facteur de transcription STAT3.

Des recherches ont montré que la stimulation par l'IL-6 des cellules HaCaT-ras A5 augmente significativement leur prolifération via la voie de signalisation JAK/STAT, alors que les fibroblastes ne sont pas affectés en raison d'une inhibition plus puissante par SOCS3, un régulateur négatif de cette voie. Cette réponse différentielle a été saisie dans un modèle mathématique décrivant la dynamique de STAT3 et de SOCS3, ce qui permet de mieux comprendre les cascades de signalisation spécifiques aux cellules.

En outre, l'IL-6 n'affecte pas seulement directement la prolifération des cellules HaCaT-ras A5, mais influence aussi indirectement l'environnement cellulaire par l'activation d'un réseau de facteurs de croissance tels que le HGF, le KGF, le VEGF et l'IL-8. L'analyse de l'expression génétique portant sur plus de 16 000 gènes a révélé que la stimulation de l'IL-6 augmente la régulation de 19 gènes liés à la voie de signalisation de l'interféron dans les cellules HaCaT-ras A5 et les fibroblastes, ce qui est en corrélation avec l'inhibition de la croissance observée dans les fibroblastes.

La découverte du rôle crucial de SerpinB4 dans la prolifération des cellules HaCaT-ras A5, confirmée par des expériences de knockdown par siRNA, souligne la régulation complexe de l'IL-6 dans les cellules tumorales et stromales. Cette compréhension globale des rôles de l'IL-6 renforce le potentiel de développement de stratégies thérapeutiques ciblées visant à moduler les voies de signalisation de l'IL-6 dans le microenvironnement tumoral.

Dans l'ensemble, les cellules HaCaT-ras A5 constituent un modèle solide pour l'exploration des interactions complexes au sein du microenvironnement tumoral, ouvrant la voie à de nouvelles approches dans la recherche sur le cancer et le développement de thérapies.

Organism Humain**Tissue** Peau**Synonyms** Clone HaCaT-ras A-5, HaCaT A-5, A-5, A5**Caractéristiques**

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494

Age	62 ans
Gender	Homme
Ethnicity	Caucasien
Cell type	Kératinocyte
Growth properties	Adhérent

Données réglementaires

Citation	HaCaT-ras A5 (numéro de catalogue Cytion 300494)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_xK16
Depositor	DKFZ, Heidelberg
GMO Status	OGM-S1 : Cette lignée HaCaT-ras A5 contient une construction plasmidique de l'oncogène c-Ha-ras pour la recherche sur la transformation épithéliale. Cette classification ne s'applique qu'à l'Allemagne et peut différer dans d'autres pays.

Données biomoléculaires

Protein expression	P53 (+), CEA (+),
Tumorigenic	Formation de tumeurs bénignes chez les souris Balb/c-nu/nu.
Karyotype	Aneuploïde (hypotétraploïde)

Manipulation

Culture Medium	DMEM, w : 4.5 g/L Glucose, w : 4 mM L-Glutamine, w : 3.7 g/L NaHCO ₃ , w : 1.0 mM Pyruvate de sodium (numéro d'article Cytion 820300a)
-----------------------	---

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494**Supplements** Compléter le milieu avec 10% de FBS**Dissociation Reagent**

Le mélange 1:1 d'EDTA (stock : 0,05%) et de trypsine (stock : 0,1%) doit être préparé chaque fois avant de détacher les cellules en utilisant du PBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺ pour obtenir une osmolarité physiologique. Les mélanges trypsine/EDTA prêts à l'emploi ne sont pas recommandés, car ils peuvent entraîner la formation d'amas de cellules. Il est possible d'utiliser TrypLETM Express (Life Technologies) à la place de la trypsine/EDTA. Le protocole du fabricant doit être suivi.

Subculturing

1. **Jeter le vieux milieu:** Retirer le milieu usagé des flacons.
2. **Laver les cellules:** Ajouter 3-5 ml de PBS (sans calcium ni magnésium) aux flacons T25, ou 5-10 ml aux flacons T75, pour laver les cellules adhérentes.
3. **Ajouter la solution d'EDTA:** Couvrir complètement la couche de cellules avec une solution d'EDTA à 0,05 % fraîchement préparée - utiliser 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75.
4. **Incubation:** Incuber les flacons à 37 degrés Celsius pendant 10 minutes.
5. **Ajouter la solution de trypsine/EDTA:** Après l'incubation, ajouter une solution de trypsine/EDTA fraîchement préparée (0,05 % de trypsine, 0,025 % d'EDTA) aux flacons, en veillant à ce que les cellules soient entièrement recouvertes - utiliser 1 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75.
6. **Surveiller le détachement:** Observer les cellules, qui devraient se détacher en 1 à 2 minutes.
7. **Neutraliser la trypsine:** Ajouter du milieu de culture cellulaire contenant du FBS pour arrêter l'activité de la trypsine.
8. **Transférer les cellules:** Distribuer la suspension cellulaire dans de nouveaux flacons pré-remplis de milieu de culture frais.

Split ratio Un rapport de 1:5 à 1:10 est recommandé**Seeding density** 1×10^4 cellules/cm²**Fluid renewal** 2 fois par semaine**Freeze medium**

Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (comprenant du FBS) + 10 % de DMSO pour une viabilité adéquate après décongélation, ou CM-1 (numéro de catalogue 800100 de Cytion), qui comprend des osmoprotectants et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryogénéisation.

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494

Thawing and Culturing Cells

1. Confirmer que le flacon est toujours congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche pour maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. Dès réception, soit conserver immédiatement le cryovial à des températures inférieures à -150°C pour assurer la préservation de l'intégrité cellulaire, soit passer à l'étape 3 si une mise en culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une mise en culture immédiate, décongeler rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à 37°C avec de l'eau propre et un agent antimicrobien, en l'agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit amas de glace.
4. Effectuer toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux, en désinfectant le cryovial avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrir soigneusement le flacon désinfecté et transférer la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant doucement.
6. Centrifuger le mélange à 300 x g pendant 3 minutes pour séparer les cellules et jeter soigneusement le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre doucement en suspension le culot cellulaire dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension entre deux flacons de culture T25 ; pour les cultures en suspension, transférer tout le milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance efficaces des cellules.
8. Respecter les protocoles de sous-culture établis pour une croissance et un entretien continus de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

Incubation Atmosphere

37°C, 5%_{CO2}, atmosphère humidifiée.

Flask Coating

Aucun

Freezing Procedure

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Cellules HaCaT-ras A5 | 300494

Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Storage Conditions

Pour une conservation à long terme, placer les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre -150 et -196 °C environ. Le stockage à -80 °C n'est acceptable qu'en tant qu'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

Contrôle de qualité / Profil génétique / HLA

Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes basées sur la luminescence.

Pour s'assurer de l'absence de contamination bactérienne, fongique ou levurienne, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.

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

Allèles 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