

Cellule HaCaT-ras A5 | 300494**Informazioni generali****Description**

Le cellule HaCaT-ras A5 sono una linea cellulare di cheratinociti cutanei umani immortalizzati spontaneamente e non tumorali, utili per lo studio delle interazioni con il microambiente tumorale e della progressione del carcinoma cutaneo. Provenienti da un uomo caucasico di 62 anni, queste cellule sono state sottoposte a selezione clonale e mutagenesi che, insieme alla regolazione autocrina dei fattori di crescita, consentono la formazione di tumori cistici benigni a crescita lenta e altamente differenziati in topi Balb/c-nu/nu. Ciò li rende un modello prezioso per studiare le dinamiche cellulari e i meccanismi molecolari della progressione tumorale in vivo.

Le cellule HaCaT-ras A5 sono particolarmente utili per chiarire le complesse interazioni tra le cellule tumorali e le cellule stromali circostanti, tra cui fibroblasti, cellule immunitarie e cellule endoteliali. Queste interazioni sono mediate dalla secrezione di varie molecole di segnalazione come fattori di crescita, citochine e proteasi, tra cui l'interleuchina-6 (IL-6) svolge un ruolo fondamentale. È noto che l'IL-6 viene disregolata in molti tipi di cancro, principalmente attraverso la sovraespressione o l'attivazione persistente del fattore di trascrizione STAT3.

La ricerca ha dimostrato che la stimolazione con IL-6 delle cellule HaCaT-ras A5 aumenta significativamente la loro proliferazione attraverso la via di segnalazione JAK/STAT, mentre i fibroblasti rimangono inalterati grazie a un'inibizione più potente da parte di SOCS3, un regolatore negativo di questa via. Questa risposta differenziale è stata catturata in un modello matematico che descrive le dinamiche di STAT3 e SOCS3, fornendo una comprensione più approfondita delle cascate di segnalazione specifiche delle cellule.

Inoltre, l'IL-6 non solo influisce direttamente sulla proliferazione delle cellule HaCaT-ras A5, ma influenza anche indirettamente l'ambiente cellulare attraverso l'attivazione di una rete di fattori di crescita come HGF, KGF, VEGF e IL-8. L'analisi dell'espressione genica, che ha coinvolto più di 16.000 geni, ha rivelato che la stimolazione dell'IL-6 upregola 19 geni correlati alla via di segnale dell'interferone sia nelle cellule HaCaT-ras A5 che nei fibroblasti, il che è correlato all'inibizione della crescita osservata nei fibroblasti.

La scoperta del ruolo cruciale di SerpinB4 nella proliferazione delle cellule HaCaT-ras A5, confermata da esperimenti di knockdown con siRNA, sottolinea l'intricata regolazione dell'IL-6 sia nelle cellule tumorali che in quelle stromali. Questa comprensione completa dei ruoli dell'IL-6 aumenta il potenziale per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate, volte a modulare le vie di segnalazione dell'IL-6 nel microambiente tumorale.

Nel complesso, le cellule HaCaT-ras A5 offrono un solido modello per esplorare la complessa interazione all'interno del microambiente tumorale, aprendo la strada a nuovi approcci nella ricerca sul cancro e nello sviluppo di terapie.

Organism Umano**Tissue** La pelle**Synonyms** HaCaT-ras clone A-5, HaCaT A-5, A-5, A5**Caratteristiche****Age** 62 anni

Cellule HaCaT-ras A5 | 300494

Gender	Uomo
Ethnicity	Caucasico
Cell type	Cheratinocita
Growth properties	Aderente

Dati normativi

Citation	HaCaT-ras A5 (catalogo Cytion numero 300494)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_xK16
Depositor	DKFZ, Heidelberg
GMO Status	GMO-S1: questa linea HaCaT-ras A5 contiene un costrutto plasmidico dell'oncogene c-Ha-ras per la ricerca sulla trasformazione epiteliale. Questa classificazione si applica solo in Germania e può variare altrove.

Dati biomolecolari

Protein expression	P53 (+), CEA (+),
Tumorigenic	Formazione di tumori benigni in topi Balb/c-nu/nu.
Karyotype	Aneuploide (ipotetraploide)

Manipolazione

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L di glucosio, w: 4 mM di L-Glutammina, w: 3,7 g/L di NaHCO ₃ , w: 1,0 mM di piruvato di sodio (articolo Cytion numero 820300a)
Supplements	Integrare il terreno di coltura con il 10% di FBS

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

La miscela 1:1 di EDTA (stock: 0,05%) e tripsina (stock: 0,1%) deve essere preparata ogni volta prima del distacco delle cellule usando PBS senza Ca²⁺ e Mg²⁺ per fornire un'osmolarità fisiologica. Si sconsiglia di utilizzare miscele pronte all'uso di tripsina/EDTA, che potrebbero causare la formazione di grumi di cellule. In alternativa, è possibile utilizzare TrypLETM Express (Life Technologies) al posto di tripsina/EDTA. Seguire il protocollo del produttore.

Subculturing

1. **Eliminare il terreno vecchio:** Rimuovere il vecchio terreno dalle fiasche.
2. **Lavare le cellule:** Aggiungere 3-5 ml di PBS (senza calcio e magnesio) alle fiasche T25 o 5-10 ml alle fiasche T75 per lavare le cellule aderenti.
3. **Aggiungere la soluzione di EDTA:** Ricoprire completamente lo strato cellulare con una soluzione di EDTA allo 0,05% preparata di fresco: utilizzare 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75.
4. **Incubazione:** Incubare le fiasche a 37 gradi Celsius per 10 minuti.
5. **Aggiungere la soluzione di tripsina/EDTA:** Dopo l'incubazione, aggiungere una soluzione di tripsina/EDTA appena preparata (0,05% di tripsina, 0,025% di EDTA) alle fiasche, assicurandosi che le cellule siano completamente coperte; utilizzare 1 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75.
6. **Monitorare il distacco:** Osservare le cellule, che dovrebbero staccarsi entro 1-2 minuti.
7. **Neutralizzare la tripsina:** Aggiungere terreno di coltura cellulare contenente FBS per bloccare l'attività della tripsina.
8. **Trasferire le cellule:** Distribuire la sospensione cellulare in nuove fiasche riempite con terreno di coltura fresco.

Split ratio

Si consiglia un rapporto da 1:5 a 1:10

Seeding density

1×10^4 cellule/cm²

Fluid renewal

2 volte a settimana

Freeze medium

Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelo, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

Cellule HaCaT-ras A5 | 300494

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO₂, atmosfera umidificata.

Flask Coating

Nessuno

Freezing Procedure

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Cellule HaCaT-ras A5 | 300494

Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Controllo di qualità / Profilo genetico / HLA

Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.

Profilo 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

Alleli 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