

**HaCaT-ras A5-cellen | 300494****Algemene informatie****Description**

HaCaT-ras A5-cellen zijn een spontaan geïmmortaliseerde, niet-tumorigene humane keratinocytencellijn, die een belangrijke rol speelt bij het bestuderen van interacties in de tumormicro-omgeving en de progressie van huidcarcinomen. Deze cellen zijn afkomstig van een 62-jarige Kaukasische man en hebben klonale selectie en mutagenese ondergaan die, in combinatie met autocriene groeifactorregulatie, de vorming van langzaam groeiende, hooggedifferentieerde goedaardige cysteuze tumoren in Balb/c-nu/nu muizen mogelijk maken. Dit maakt ze tot een waardevol model voor het onderzoeken van de cellulaire dynamiek en moleculaire mechanismen van tumorprogressie in vivo.

De HaCaT-ras A5-cellen zijn vooral nuttig voor het ophelderen van de complexe interacties tussen tumorcellen en omliggende stromale cellen, waaronder fibroblasten, immuuncellen en endotheelcellen. Deze interacties worden gemedieerd door de afscheiding van verschillende signaalmoleculen zoals groeifactoren, cytokinen en proteasen, waarbij interleukine-6 (IL-6) een centrale rol speelt. Van IL-6 is bekend dat het ontreguleerd raakt in veel kankertypes, voornamelijk door overexpressie of aanhoudende activering van de STAT3 transcriptiefactor.

Onderzoek heeft aangetoond dat IL-6 stimulatie van HaCaT-ras A5 cellen hun proliferatie aanzienlijk verhoogt via de JAK/STAT signaalroute, terwijl fibroblasten onaantast blijven door een sterkere remming door SOCS3, een negatieve regulator van deze signaalroute. Deze differentiële respons is vastgelegd in een wiskundig model dat de dynamiek van STAT3 en SOCS3 beschrijft, waardoor een beter begrip ontstaat van celspecifieke signaalcascades.

Verder heeft IL-6 niet alleen direct invloed op de proliferatie van HaCaT-ras A5 cellen, maar beïnvloedt het ook indirect de cellulaire omgeving via de activering van een netwerk van groeifactoren zoals HGF, KGF, VEGF en IL-8. Genexpressieanalyse met meer dan 16.000 genen toonde aan dat IL-6 stimulatie 19 genen upreguleert die gerelateerd zijn aan de interferonsignaalroute in zowel HaCaT-ras A5 cellen als fibroblasten, wat correleert met de waargenomen groeiremming in fibroblasten.

De ontdekking van de cruciale rol van SerpinB4 in de proliferatie van HaCaT-ras A5 cellen, bevestigd door siRNA knockdown experimenten, onderstreept de ingewikkelde regulatie door IL-6 in zowel tumor- als stromale cellen. Dit uitgebreide inzicht in de rol van IL-6 vergroot het potentieel voor het ontwikkelen van gerichte therapeutische strategieën gericht op het moduleren van IL-6 signaalroutes in de tumormicro-omgeving.

Over het geheel genomen bieden HaCaT-ras A5-cellen een robuust model voor het onderzoeken van de complexe interactie binnen de tumormicro-omgeving, wat de weg vrijmaakt voor nieuwe benaderingen in kankeronderzoek en therapieontwikkeling.

**Organism** Mens**Tissue** Huid**Synonyms** HaCaT-ras kloon A-5, HaCaT A-5, A-5, A5**Kenmerken****Age** 62 jaar

**HaCaT-ras A5-cellen | 300494****Gender** Mannelijk**Ethnicity** Kaukasisch**Cell type** Keratinocyt**Growth properties** Aanhangend**Regelgevende gegevens****Citation** HaCaT-ras A5 (Cytion catalogusnummer 300494)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_xK16**Depositor** DKFZ, Heidelberg**GMO Status** GMO-S1: Deze HaCaT-ras A5-lijn bevat een plasmide-gebonden c-Ha-ras oncogen voor onderzoek naar epitheliale transformatie. Deze classificatie is alleen van toepassing binnen Duitsland en kan elders afwijken.**Biomoleculaire gegevens****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Vorming van goedaardige tumoren in Balb/c-nu/nu-muizen.**Karyotype** Aneuploid (hypotetraploid)**Omgaan met****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L Glucose, w: 4 mM L-Glutamine, w: 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, w: 1,0 mM Natriumpyruvaat (Cytion artikelnummer 820300a)**Supplements** Vul het medium aan met 10% FBS

## HaCaT-ras A5-cellen | 300494

**Dissociation Reagent**

Het 1:1 mengsel van EDTA (voorraad: 0,05%) en trypsine (voorraad: 0,1%) moet telkens vóór het losmaken van de cellen worden bereid met PBS zonder Ca<sup>2+</sup> en Mg<sup>2+</sup> om een fysiologische osmolariteit te verkrijgen. Kant-en-klare mengsels van trypsine/EDTA worden niet aanbevolen, omdat dit kan leiden tot klontering van de cellen. Als alternatief kan TrypLETM Express (Life Technologies) in plaats van trypsine/EDTA worden gebruikt. Het protocol van de fabrikant moet worden gevolgd.

**Subculturing**

1. **Oud medium weggoeien:** Verwijder het oude medium uit de kolven.
2. **Cellen wassen:** Voeg 3-5 ml PBS (zonder calcium en magnesium) toe aan T25-flesjes of 5-10 ml aan T75-flesjes om de aanhangende cellen te wassen.
3. **EDTA-oplossing toevoegen:** Bedek de cellaag volledig met een vers bereide 0,05% EDTA-oplossing - gebruik 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes.
4. **Incubatie:** Incubeer de kolven gedurende 10 minuten bij 37 graden Celsius.
5. **Trypsine/EDTA-oplossing toevoegen:** Voeg na de incubatie een vers bereide trypsine/EDTA-oplossing (0,05% trypsine, 0,025% EDTA) toe aan de kolven en zorg ervoor dat de cellen volledig bedekt zijn - gebruik 1 ml voor T25 kolven en 2,5 ml voor T75 kolven.
6. **Controleer onthechting:** Observeer de cellen, die binnen 1-2 minuten los zouden moeten komen.
7. **Neutraliseer trypsine:** Voeg FBS-bevattend celkweekmedium toe om de trypsineactiviteit te stoppen.
8. **Cellen overbrengen:** Doseer de celsuspensie in nieuwe kolven die gevuld zijn met vers kweekmedium.

**Split ratio**

Een verhouding van 1:5 tot 1:10 wordt aanbevolen

**Seeding density**

$1 \times 10^4$  cellen/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal**

2 keer per week

**Freeze medium**

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimedum (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

## HaCaT-ras A5-cellen | 300494

### Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij  $300 \times g$  om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

### Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , bevochtigde atmosfeer.

### Flask Coating

Geen

### Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

### Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

## HaCaT-ras A5-cellen | 300494

### Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

## Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

### Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.

### STR profiel

**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-allelen

**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