

## HaCaT-ras A5-celler | 300494

## Generell informasjon

## Description

HaCaT-ras A5-celler er en spontant udødeliggjort, ikke-tumorigen human hudkeratinocyttecellelinje, som er viktig i studier av interaksjoner med tumormikromiljøet og utviklingen av hudkreft. Disse cellene, som stammer fra en 62 år gammel kaukasisk mann, har gjennomgått klonal seleksjon og mutagenese, noe som sammen med autokrin vekstfaktorregulering muliggjør dannelsen av langsomtvoksende, høyt differensierte, godartede cystiske svulster i Balb/c-nu/nu-mus. Dette gjør dem til en verdifull modell for å undersøke celledynamikken og de molekylære mekanismene bak tumorprogresjon in vivo.

HaCaT-ras A5-cellene er spesielt nyttige for å belyse de komplekse interaksjonene mellom tumorceller og omkringliggende stromaceller, inkludert fibroblaster, immunceller og endotelceller. Disse interaksjonene medieres av utskillelsen av ulike signalmolekyler som vekstfaktorer, cytokiner og proteaser, der interleukin-6 (IL-6) spiller en sentral rolle. Det er kjent at IL-6 blir dysregulert i mange krefttyper, først og fremst gjennom overuttrykk eller vedvarende aktivering av transkripsjonsfaktoren STAT3.

Forskning har vist at IL-6-stimulering av HaCaT-ras A5-celler øker proliferasjonen deres betydelig via JAK/STAT-signalveien, mens fibroblaster forblir upåvirket på grunn av en kraftigere hemming av SOCS3, en negativ regulator av denne signalveien. Denne differensierte responsen er fanget opp i en matematisk modell som beskriver dynamikken i STAT3 og SOCS3, noe som gir en dypere forståelse av cellespesifikke signaleringskaskader.

IL-6 påvirker ikke bare HaCaT-ras A5-cellenes proliferasjon direkte, men påvirker også indirekte det cellulære miljøet gjennom aktivering av et nettverk av vekstfaktorer som HGF, KGF, VEGF og IL-8. Genuttryksanalyse av over 16 000 gener avslørte at IL-6-stimulering oppregulerer 19 gener relatert til interferonsignalveien i både HaCaT-ras A5-celler og fibroblaster, noe som korrelerer med den observerte veksthemmingen i fibroblaster.

Oppdagelsen av SerpinB4s avgjørende rolle i proliferasjonen av HaCaT-ras A5-celler, bekreftet gjennom siRNA-knockdown-eksperimenter, understreker den intrikate reguleringen av IL-6 i både tumor- og stromaceller. Denne omfattende forståelsen av IL-6s roller øker potensialet for å utvikle målrettede terapeutiske strategier som tar sikte på å modulere IL-6s signalveier i tumormikromiljøet.

HaCaT-ras A5-celler er en robust modell for å utforske det komplekse samspillet i tumormikromiljøet, noe som baner vei for nye tilnærminger innen kreftforskning og terapiutvikling.

**Organism** Menneskelig

**Tissue** Hud

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

## Kjennetegn

**Age** 62 år

**Gender** Mann

**HaCaT-ras A5-celler | 300494****Ethnicity**      Kaukasisk**Cell type**      Keratinocyt**Growth properties**      Vedhengende**Regulatoriske data****Citation**      HaCaT-ras A5 (Cytion katalognummer 300494)**Biosafety level**      1**NCBI\_TaxID**      9606**CellosaurusAccession**      CVCL\_xK16**Depositor**      DKFZ, Heidelberg**GMO Status**      GMO-S1: Denne HaCaT-ras A5-linjen inneholder en plasmidbåren c-Ha-ras onkogenkonstruksjon for forskning på epitelial transformasjon. Denne klassifiseringen gjelder bare i Tyskland og kan variere andre steder.**Biomolekylære data****Protein expression**      P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic**      Dannelse av godartede svulster hos Balb/c-nu/nu-mus.**Karyotype**      Aneuploid (hypotetraploid)**Håndtering****Culture Medium**      DMEM, m: 4,5 g/L glukose, m: 4 mM L-glutamin, m: 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, m: 1,0 mM natriumpyruvat (Cytion artikkelnummer 820300a)**Supplements**      Suppler mediet med 10 % FBS

## HaCaT-ras A5-celler | 300494

**Dissociation Reagent**

Blandingen 1:1 av EDTA (lager: 0,05 %) og trypsin (lager: 0,1 %) må tilberedes hver gang før cellene løsnes ved hjelp av PBS uten Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup> for å gi en fysiologisk osmolaritet. Bruksklare blandinger av trypsin/EDTA anbefales ikke, da dette kan føre til celleklumper. Som et alternativ kan TrypLETM Express (Life Technologies) brukes i stedet for trypsin/EDTA. Produsentens protokoll skal følges.

**Subculturing**

1. **Kast det gamle mediet:** Fjern det gamle mediet fra kolbene.
2. **Vask cellene:** Tilsett 3-5 ml PBS (uten kalsium og magnesium) til T25-kolber, eller 5-10 ml til T75-kolber, for å vaske de adherente cellene.
3. **Tilsett EDTA-løsning:** Dekk cellelaget fullstendig med en nylaget 0,05 % EDTA-løsning - bruk 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber.
4. **Inkubering:** Inkuber kolbene ved 37 grader Celsius i 10 minutter.
5. **Tilsett trypsin/EDTA-løsning:** Etter inkubasjonen tilsettes en nylaget trypsin/EDTA-løsning (0,05 % trypsin, 0,025 % EDTA) til kolbene, og sørg for at cellene er helt dekket - bruk 1 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber.
6. **Overvåk løsgjøring:** Observer cellene, som skal løsne i løpet av 1-2 minutter.
7. **Nøytraliser trypsin:** Tilsett FBS-holdig cellekulturmedium for å stoppe trypsinaktiviteten.
8. **Overfør celler:** Fordel cellesuspensjonen i nye kolber som er fylt med nytt dyrkningsmedium.

**Split ratio**

Et forhold på 1:5 til 1:10 anbefales

**Seeding density**

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

**Fluid renewal**

2 ganger per uke

**Freeze medium**

Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter opptining, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoinduisert stress.

## HaCaT-ras A5-celler | 300494

### Thawing and Culturing Cells

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrost ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkingsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved  $300 \times g$  i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspender cellepelleten forsiktig i 10 ml nytt dyrkingsmedium. For adherente celler, del suspensjonen mellom to T25-kulturkolber; for suspensjonskulturer, overfør alt mediet til én T25-kolbe for å fremme effektiv celleinteraksjon og vekst.
8. Følg etablerte subkulturprotokoller for fortsatt vekst og vedlikehold av cellelinjen, noe som sikrer pålitelige eksperimentelle resultater.

### Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , befuktet atmosfære.

### Flask Coating

Ingen

### Freezing Procedure

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca.  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

### Shipping Conditions

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca.  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

## HaCaT-ras A5-celler | 300494

### Storage Conditions

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

## Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

### Sterility

Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.

For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.

### 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-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