

Celule HaCaT-ras A5 | 300494**Informații generale****Description**

Celulele HaCaT-ras A5 sunt o linie celulară imortalizată spontan, netumorigenă, de keratinocite cutanate umane, instrumentală în studiul interacțiunilor micro-mediului tumoral și al progresiei carcinomului cutanat. Provenind de la un bărbat caucazian în vârstă de 62 de ani, aceste celule au fost supuse selecției clonale și mutagenezei, care, împreună cu reglarea autocrină a factorului de creștere, permit formarea de tumori chistice benigne cu creștere lentă și foarte diferențiate la șoarecii Balb/c-nu/nu. Acest lucru le face un model valoros pentru investigarea dinamicii celulare și a mecanismelor moleculare ale progresiei tumorale in vivo.

Celulele HaCaT-ras A5 sunt deosebit de utile pentru elucidarea interacțiunilor complexe dintre celulele tumorale și celulele stromale din jur, inclusiv fibroblastele, celulele imunitare și celulele endoteliale. Aceste interacțiuni sunt mediate de secreția diferitelor molecule de semnalizare, cum ar fi factorii de creștere, citokinele și proteazele, printre care interleukina-6 (IL-6) joacă un rol esențial. Se știe că IL-6 devine dereglementată în multe tipuri de cancer, în principal prin supraexprimarea sau activarea persistentă a factorului de transcripție STAT3.

Cercetările au arătat că stimularea cu IL-6 a celulelor HaCaT-ras A5 crește semnificativ proliferarea acestora prin intermediul căii de semnalizare JAK/STAT, în timp ce fibroblastele rămân neafectate datorită unei inhibări mai puternice de către SOCS3, un regulator negativ al acestei căi. Acest răspuns diferențial a fost capturat într-un model matematic care descrie dinamica STAT3 și SOCS3, oferind o înțelegere mai profundă a cascadelor de semnalizare specifice celulelor.

În plus, IL-6 nu numai că afectează în mod direct proliferarea celulelor HaCaT-ras A5, ci și influențează indirect mediul celular prin activarea unei rețele de factori de creștere precum HGF, KGF, VEGF și IL-8. Analiza expresiei genice implicând peste 16 000 de gene a arătat că stimularea IL-6 reglează 19 gene legate de calea de semnal a interferonului atât în celulele HaCaT-ras A5, cât și în fibroblaste, ceea ce se corelează cu inhibarea creșterii observată în fibroblaste.

Descoperirea rolului crucial al SerpinB4 în proliferarea celulelor HaCaT-ras A5, confirmată prin experimente siRNA knockdown, subliniază reglementarea complexă a IL-6 atât în celulele tumorale, cât și în cele stromale. Această înțelegere cuprinzătoare a rolurilor IL-6 sporește potențialul de dezvoltare a strategiilor terapeutice țintite care vizează modularea căilor de semnalizare IL-6 în micro-mediul tumoral.

În general, celulele HaCaT-ras A5 oferă un model robust pentru explorarea interacțiunii complexe din cadrul micro-mediului tumoral, deschizând calea pentru noi abordări în cercetarea cancerului și dezvoltarea terapiei.

Organism Om**Tissue** Piele**Synonyms** Clona HaCaT-ras A-5, HaCaT A-5, A-5, A5**Caracteristici****Age** 62 de ani**Gender** Masculin

Cellule HaCaT-ras A5 | 300494**Ethnicity** Caucazian**Cell type** Keratinocit**Growth properties** Aderent**Date de reglementare****Citation** HaCaT-ras A5 (număr de catalog Cytion 300494)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_xK16**GMO Status** OMG-S1: Această linie HaCaT-ras A5 conține o construcție oncogenă c-Ha-ras plasmidă pentru cercetarea transformării epiteliale. Această clasificare se aplică numai în Germania și poate diferi în alte părți.**Date biomoleculare****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Formarea de tumori benigne la șoarecii Balb/c-nu/nu.**Karyotype** Aneuploid (hipotetraploid)**Manipulare****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glucoză, w: 4 mM L-glutamină, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM piruvat de sodiu (număr articol Cytion 820300a)**Supplements** Suplimentați mediul cu 10% FBS**Dissociation Reagent** Amestecul 1:1 de EDTA (stoc: 0,05%) și tripsină (stoc: 0,1%) trebuie pregătit de fiecare dată înainte de detașarea celulelor folosind PBS fără Ca²⁺ și Mg²⁺ pentru a asigura o osmolaritate fiziologică. Amestecurile de tripsină/EDTA gata de utilizare nu sunt recomandate, deoarece pot duce la aglomerarea celulelor. Ca alternativă, se poate utiliza TrypLETM Express (Life Technologies) în loc de tripsină/EDTA. Trebuie urmat protocolul producătorului.

Celule HaCaT-ras A5 | 300494

Subculturing

1. **Aruncați mediul vechi:** Îndepărtați mediul vechi din flacoane.
2. **Spălarea celulelor:** Se adaugă 3-5 ml de PBS (fără calciu și magneziu) în flacoane T25 sau 5-10 ml în flacoane T75, pentru a spăla celulele aderente.
3. **Se adaugă soluție EDTA:** Acoperiți complet stratul celular cu o soluție EDTA 0,05% proaspăt preparată - utilizați 1-2 ml pentru flacoane T25 și 2,5 ml pentru flacoane T75.
4. **Incubare:** Incubați flacoanele la 37 de grade Celsius timp de 10 minute.
5. **Se adaugă soluție de tripsină/EDTA:** După incubare, adăugați o soluție de tripsină/EDTA proaspăt preparată (0,05% tripsină, 0,025% EDTA) în flacoane, asigurându-vă că celulele sunt acoperite complet - utilizați 1 ml pentru flacoane T25 și 2,5 ml pentru flacoane T75.
6. **Monitorizați detașarea:** Observați celulele, care ar trebui să se desprindă în 1-2 minute.
7. **Neutralizați tripsina:** Adăugați mediu de cultură celulară care conține FBS pentru a opri activitatea tripsinei.
8. **Se transferă celulele:** Se distribuie suspensia celulară în flacoane noi preumplute cu mediu de cultură proaspăt.

Seeding density

 1×10^4 celule/cm²

Fluid renewal

de 2 ori pe săptămână

Freeze medium

Ca mediu de crioconservare, folosim mediu de creștere complet (inclusiv FBS) + 10% DMSO pentru o viabilitate adecvată după dezghețare sau CM-1 (număr de catalog Cytion 800100), care include osmoprotectanți optimizați și stabilizatori metabolici pentru a spori recuperarea și a reduce stresul indus de criogenie.

Celule HaCaT-ras A5 | 300494**Thawing and
Culturing Cells**

1. Confirmați că flaconul rămâne profund înghețat la livrare, deoarece celulele sunt expediate pe gheață carbonică pentru a menține temperaturi optime în timpul transportului.
2. La primire, fie depozitați crioviola imediat la temperaturi sub -150 °C pentru a asigura păstrarea integrității celulare, fie treceți la etapa 3 dacă este necesară cultivarea imediată.
3. Pentru cultivarea imediată, dezghețați rapid flaconul prin scufundarea acestuia într-o baie de apă la 37 °C cu apă curată și un agent antimicrobian, agitându-l ușor timp de 40-60 de secunde până când rămâne o mică aglomerare de gheață.
4. Se efectuează toate etapele ulterioare în condiții sterile, într-o hotă cu flux, dezinfectând crioviola cu etanol 70% înainte de deschidere.
5. Se deschide cu grijă flaconul dezinfectat și se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugare de 15 ml care conține 8 ml de mediu de cultură la temperatura camerei, amestecând ușor.
6. Se centrifughează amestecul la 300 x g timp de 3 minute pentru a separa celulele și se aruncă cu grijă supernatantul care conține mediul de congelare rezidual.
7. Se resuspendă ușor peletul celular în 10 ml de mediu de cultură proaspăt. Pentru celulele aderente, împărțiți suspensia între două flacoane de cultură T25; pentru culturile în suspensie, transferați tot mediul într-un flacon T25 pentru a promova interacțiunea și creșterea celulară eficientă.
8. Respectați protocoalele de subcultură stabilite pentru creșterea și menținerea continuă a liniei celulare, asigurând rezultate experimentale fiabile.

**Incubation
Atmosphere**

37°C, 5% CO_2 , atmosferă umidificată.

Flask Coating

Niciuna

**Freezing
Procedure**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

**Shipping
Conditions**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

Celule HaCaT-ras A5 | 300494

Storage Conditions

Pentru conservarea pe termen lung, flacoanele se plasează în azot lichid în fază de vapori la o temperatură cuprinsă între -150 și -196 °C. Păstrarea la -80 °C este acceptabilă doar ca o scurtă etapă intermediară înainte de transferul în azot lichid.

Controlul calității / Profil genetic / HLA

Sterility

Contaminarea cu micoplasmă este exclusă utilizând atât teste bazate pe PCR, cât și metode de detectare a micoplasmei bazate pe luminescență.

Pentru a se asigura că nu există contaminare bacteriană, fungică sau de drojdie, culturile celulare sunt supuse unor inspecții vizuale zilnice.

Alele 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