

**Celice HaCaT-ras A5 | 300494****Splošne informacije****Description**

Celice HaCaT-ras A5 so spontano imortalizirana, netumorigena celična linija človeških kožnih keratinocitov, ki je uporabna pri preučevanju interakcij tumorskega mikrookolja in napredovanja kožnega karcinoma. Te celice, ki izvirajo iz 62-letnega kavkaškega moškega, so bile podvržene klonski selekciji in mutageni, ki skupaj z avtokrinim uravnavanjem ravnih dejavnikov omogočata nastanek počasi rastočih, visoko diferenciranih benignih cističnih tumorjev pri miših Balb/c-nu/nu. Zato so dragocen model za raziskovanje celične dinamike in molekularnih mehanizmov napredovanja tumorjev in vivo.

Celice HaCaT-ras A5 so še posebej uporabne za pojasnjevanje zapletenih interakcij med tumorskimi celicami in okoliškimi stromalnimi celicami, vključno s fibroblasti, imunskimi celicami in endotelijskimi celicami. Te interakcije so posredovane z izločanjem različnih signalnih molekul, kot so rastni dejavniki, citokini in proteaze, med katerimi ima ključno vlogo interleukin-6 (IL-6). Znano je, da je IL-6 pri številnih vrstah raka moten, predvsem zaradi prekomernega izražanja ali trajne aktivacije transkripcijskega faktorja STAT3.

Raziskave so pokazale, da stimulacija celic HaCaT-ras A5 z IL-6 znatno poveča njihovo proliferacijo prek signalne poti JAK/STAT, medtem ko fibroblasti zaradi močnejše inhibicije s SOCS3, negativnim regulatorjem te poti, ostanejo nedotaknjeni. Ta različen odziv je bil zajet v matematičnem modelu, ki opisuje dinamiko STAT3 in SOCS3, kar omogoča globlje razumevanje celično specifičnih signalnih kaskad.

Poleg tega IL-6 ne vpliva le neposredno na proliferacijo celic HaCaT-ras A5, temveč tudi posredno na celično okolje z aktivacijo mreže ravnih dejavnikov, kot so HGF, KGF, VEGF in IL-8. Analiza izražanja genov, ki vključuje več kot 16 000 genov, je pokazala, da stimulacija z IL-6 poveča regulacijo 19 genov, povezanih z interferonsko signalno potjo tako v celicah HaCaT-ras A5 kot v fibroblastih, kar je povezano z opaženo zavoro rasti v fibroblastih.

Odkritje ključne vloge SerpinB4 pri proliferaciji celic HaCaT-ras A5, ki je bilo potrjeno s poskusi izklopa siRNA, poudarja zapleteno regulacijo IL-6 tako v tumorskih kot stromalnih celicah. To celovito razumevanje vlog IL-6 povečuje možnosti za razvoj ciljno usmerjenih terapevtskih strategij, namenjenih modulaciji signalnih poti IL-6 v tumorskem mikrookolju.

Na splošno so celice HaCaT-ras A5 zanesljiv model za raziskovanje zapletenih medsebojnih vplivov v tumorskem mikrookolju, kar utira pot novim pristopom pri raziskovanju raka in razvoju terapije.

**Organism** Človek**Tissue** Koža**Synonyms** HaCaT-ras klon A-5, HaCaT A-5, A-5, A5**Značilnosti****Age** 62 let**Gender** Moški

**Celice HaCaT-ras A5 | 300494****Ethnicity** Kavkaški**Cell type** Keratinociti**Growth properties** Pripadajoče**Regulativni podatki****Citation** HaCaT-ras A5 (kataloška številka Cytion 300494)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_xK16**GMO Status** GSO-S1: Ta linija HaCaT-ras A5 vsebuje plazmidni konstrukt onkogenega c-Ha-ras za raziskave epitelijske transformacije. Ta razvrstitev velja samo v Nemčiji in se lahko drugje razlikuje.**Biomolekularni podatki****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Nastanek benignih tumorjev pri miših Balb/c-nu/nu.**Karyotype** Aneuploidni (hipotraploidni)**Ravnanje s spletno stranjo****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glukoze, w: 4 mM L-glutamina, w: 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, w: 1,0 mM natrijevega piruvata (številka izdelka Cytion 820300a)**Supplements** Gojišče dopolnite z 10 % FBS**Dissociation Reagent** Mešanico EDTA (zaloga: 0,05 %) in tripsina (zaloga: 0,1 %) v razmerju 1:1 je treba pripraviti vsakič pred ločitvijo celic z uporabo PBS brez Ca<sup>2+</sup> in Mg<sup>2+</sup>, da se zagotovi fiziološka osmolarnost. Pripravljene mešanice tripsina/EDTA niso priporočljive, saj lahko pride do zlepljanja celic. Namesto tega lahko namesto tripsina/EDTA uporabimo TrypLETM Express (Life Technologies). Upoštevati je treba protokol proizvajalca.

**Celice HaCaT-ras A5 | 300494****Subculturing**

1. **Zavržite star medij:** Odstranite staro gojišče iz bučk.
2. **Izperite celice:** V bučke T25 dodajte 3-5 ml PBS (brez kalcija in magnezija), v bučke T75 pa 5-10 ml, da sperete prilepljene celice.
3. **Dodajte raztopino EDTA:** Plast celic popolnoma prekrijte s sveže pripravljeno 0,05 % raztopino EDTA - uporabite 1-2 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75.
4. **Inkubacija:** Bučke inkubirajte 10 minut pri 37 stopinjah Celzija.
5. **Dodajte raztopino tripsina/EDTA:** Po inkubaciji v bučke dodajte sveže pripravljeno raztopino tripsina/EDTA (0,05 % tripsin, 0,025 % EDTA), tako da so celice popolnoma pokrite - uporabite 1 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75.
6. **Spremljajte ločevanje:** Opazujte celice, ki se morajo odcepiti v 1-2 minutah.
7. **Nevtralizirajte tripsin:** Dodajte gojišče za gojenje celic, ki vsebuje FBS, da ustavite delovanje tripsina.
8. **Prenesite celice:** Celično suspenzijo prelijte v nove erlenmajerice, predhodno napolnjene s svežim gojiščem.

**Seeding density** $1 \times 10^4$  celic/cm<sup>2</sup>**Fluid renewal**

2-krat na teden

**Freeze medium**

Kot gojišče za kriokonzervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče (vključno s FBS) + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi ali CM-1 (kataloška številka 800100 podjetja Cytion), ki vključuje optimizirane osmoprotektante in presnovne stabilizatorje za izboljšanje okrevanja in zmanjšanje stresa, povzročene s kriom.

## Celice HaCaT-ras A5 | 300494

### Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu krioviala takoj shranite pri temperaturi pod  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa kriovial razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri  $300 \times g$  3 minute, da ločite celice, in previdno zavržite supernatant, ki vsebuje ostanke zamrzovalnega gojišča.
7. Pelet celic nežno ponovno suspendirajte v 10 ml svežega gojišča. Pri adherentnih celicah suspenzijo razdelite med dve bučki T25; pri suspenzijskih kulturah prenesite vse gojišče v eno bučko T25, da spodbudite učinkovito interakcijo in rast celic.
8. Upoštevajte uveljavljene protokole subkultur za nadaljnjo rast in vzdrževanje celične linije ter tako zagotovite zanesljive rezultate poskusov.

### Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , vlažno ozračje.

### Flask Coating

Nič

### Freezing Procedure

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

### Shipping Conditions

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

## Celice HaCaT-ras A5 | 300494

### Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vial postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do -196 °C. Shranjevanje pri -80 °C je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

## Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA

### Sterility

Kontaminacija z mikoplazmo se izključi z uporabo testov na podlagi PCR in metod za odkrivanje mikoplazme na podlagi luminiscence.

Da se zagotovi, da ni kontaminacije z bakterijami, glivami ali kvasovkami, se celične kulture dnevno vizualno pregledujejo.

### Aleli 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