

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS

Application Form to Deposit an iPS cell line of human origin

Documentos que se acompañan:

Attached documents:

Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.

A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval

Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.

A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line

C. V. del investigador principal (una página; formato libre).

A one page CV for the Principal Investigator

Otros (especificar).

Others (specify)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea:

Name of the line:

[TSD] FiPS-4F-3-1

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte

Principal Investigator:

Tipo de célula de la que se obtiene la línea:

Cell type origin of the cell line

Fibroblastos humanos comerciales (Coriell; GM00527) de paciente afecto con la enfermedad de Tay-Sachs (TSD HEXOSAMINIDASE A)

Human commercial fibroblasts (Coriell; GM00527) from a patient affected with Tay-Sachs Disease (TSD HEXOSAMINIDASE A)

¿El sujeto fuente tiene alguna patología?

Has the donor any pathological condition?

NO

No

SÍ

Yes

(especificar) Enfermedad de Tay-Sachs
(specify) Tay-Sachs Disease

¿La patología es de origen genético?

Is the pathological condition of genetic origin?

NO

No

SÍ

Yes

(especificar)
(specify)

Mutación compuesta heterocigota c.1260G>C que corresponde al cambio aminoacídico p.Trp420Cys. Y la mutación del otro alelo c.1330+1G>A que corresponde a la mutación de splicing IVS11+1G>A.

Compound heterozygote mutation c.1260G> C corresponding to aminoacidic change p.Trp420Cys. And other allele mutation c.1330 +1 G> A corresponding to splicing IVS11 +1 G> A. (see annex 6)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

Se realiza análisis de marcadores STR en [TSD] FiPS-4F-3-1 y fibroblastos de origen

Analysis of STR markers in [TSD]FiPS-4F-3-1 and original fibroblast

Cariotipo/Karyotype

Euploide/Euploid **Anormal/Atypical** (especificar/specify) **46,XY**

(Ver anexo 3)

(See annex 3)

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	Teléfono (phone): 93 3160360 Fax: 93 3160362 E-mail: blc@cmrb.eu

SECCIÓN 3

Section 3

Datos de la Línea Celular

Details of Cell Line

Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> Fibroblastos humanos comerciales (Coriell; GM00527) de paciente afecto con la enfermedad de Tay-Sachs (TSD HEXOSAMINIDASE A) <i>Human commercial fibroblasts (Coriell; GM00527) from a patient affected with Tay-Sachs Disease (TSD HEXOSAMINIDASE A)</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> Fecha no disponible <i>Data not available</i>	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> febrero 2009 <i>February, 2009</i>

Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)

Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).

Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk).

Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l

GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, InVitrogen corporation), 8 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Cambrex), 20% Knockout Serum Replacement (InVitrogen) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation).

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio* 1:2-1:3 cada 6/7 días; 1:2-1:3 every 6/7 days

Método de pase: *Passage method* mecánico, mechanical

Xenobióticos
Xenobiotics

si
Yes

no
No

Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo

(forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)

Description of the morphological characteristics of the line in culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)

Colonias grandes poligonales, ligeramente aplanadas, de un tamaño entre 1- 3 mm de diámetro de diversas formas con bordes lisos. Células de tamaño uniforme y una elevada relación núcleo/citoplasma.

Large and flat polygonal colonies, with uniformly sized cells of 1-3 mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Bacteriología
(Bacteriology)

Micología
(Mycology)

Micoplasma: PCR Negativo
(Mycoplasma: by PCR) Negative
(Anexo 1)

Marcadores:				
<i>Markers</i> (Anexo2)	Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct 4	inmunofluorescencia	29	+	
Nanog	inmunofluorescencia	29	+	
Rex 1 (opcional/optional)				
Sox 2	inmunofluorescencia	29	+	
SSEA3				
SSEA4	inmunofluorescencia	29	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	29	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	29	+	
Telomerasa/Telomerase (opcional/optional)				
Fosfatasa Alc. /Alkaline phosphatase		29	+	
Otros / Others				

Capacidad de diferenciación									
<i>Differentiation capacity</i>									
	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>
In Vitro <i>In vitro</i> (Anexo 4)	Tuj-1	p29	+	AFP	p29	+	ASMA	29	+
				Foxa2		+	AAS		+
In vivo/ in vivo pase/passage: (Anexo 5)	p29			Método: Formación de teratomas en ratones SCID <i>Method: Teratoma formation in SCID mice</i>			Resultado: + <i>Result: +</i>		

OPCIONAL/OPTIONAL:
Reprogramación del perfil de expresión génica <i>Reprogramming of gene expression profile</i>
Reprogramación del perfil de metilación del ADN <i>Reprogramming of DNA methylation profile</i>
Longitud telomérica <i>Telomere length</i>

Descripción de las características de diferenciación *in Vitro*

Description of the differentiation characteristics in vitro

Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico. Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio de cultivo. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 sobre células PA6 (ver Anexo 4).

Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture in culture medium. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 on PA6 cells (see Annex 4).

Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas

Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation

Inyección intratesticular en ratones SCID de clumps de células indiferenciadas y tras aproximadamente 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (ver Anexo 5).

Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. Around 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 5).

Datos de la tipificación HLA No realizado

HLA typification data Not carried out

Integración de los transgenes de reprogramación: gPCR para integración de provirus

Integration of reprogramming transgenes: gPCR for provirus integration

Una única inserción en el genoma (no mapeada) que después se escindió con la expresión de la recombinasa CRE. Comprobado por southern-blot. CRE se introdujo con un sistema lentiviral no integrativo y no se ha comprobado la integración de la recombinada CRE en el genoma.

There was only one insertion in the genome (not mapped) that was removed by CRE recombinase expression. It was checked by Southern-blot. CRE was delivered by a non integrative Lentiviral system so the integration of the provirus hasn't been checked.

Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR

Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR

By qRT-PCR. Transgenes are silenced

Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR

Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases

Long-term maintenance in culture: >20 passages

La línea se ha mantenido en cultivo durante 45 pases.

The line has been culture during 45 passages

Pase en el momento del registro

Passage at the time of the recording

pase 32

passage 32

<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No No <input type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):
Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

La línea celular fue generada mediante núcleo infección con un DNA lineal que contiene un cassette de reprogramación compuesto de un promotor CAG expresando un policistron de 5 genes: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (murinos) y GFP. Los 5 genes están conectados por '2A-self leaving peptides'. El cassette de reprogramación está flanqueado por sitios loxP, otorgando la posibilidad de eliminar el cassette de reprogramación utilizando recombinasa CRE.

La línea sufrió una única inserción del transgen (demostrado por southern). Los sitios de inserción NO han sido mapeados.

La línea se cultivó hasta pase 12. Se infectó con un lentivirus no integrativo expresando CRE recombinase. Se aisló el subclon 3-1 y se confirmó la eliminación del cassette de reprogramación (confirmado por southern). El subclon fue pasado 7 pases más antes de banquearlo.

Nota: si bien se utilizó un lentivirus no integrativo para expresar CRE recombinase, existe la posibilidad de que haya integraciones del provirus en el genoma de la líneas. Esto no se ha chequeado.

The cell line was generated by nucleoinfection with a linear DNA containing a reprogramming cassette composed of a CAG promoter by expressing a policistron 5 genes: Oct4, SOX2, Klf4 and c-myc (all murine) and GFP. The 5 genes are connected by '2A-self leaving peptides'. The reprogramming cassette is flanked by loxP sites, giving the possibility of eliminating the cassette using CRE recombinase.

The line suffered a single insertion of the transgene (demonstrated by southern). No insertion sites were mapped.

The line was cultured up to passage 12. It was infected with a not integrative lentivirus expressing CRE recombinase. The subclon 3-1 was isolated and confirmed the elimination of the reprogramming cassette (confirmed by southern). The subclon was cultured 7 more passages before it was banked.

Note: Although using a not integrative lentivirus to express CRE recombinase, could be a possibility of integrations of the provirus in the genome of the lines. This has not been checked

Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

SECCIÓN 4**Declaración**

Confirmo que la información contenida en estos impresos es cierta y asumo total responsabilidad sobre la misma.

I confirm that the information contained in this form is true and I assume total responsibility for it.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i>  Fecha / Date: 23/12/2013 	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha / Date 23/12/2013
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Margarita Sala Azón Gerente Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA NIF G-63687222	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88 08003, Barcelona	Teléfono / Telephone: 933160303 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmr.eu

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [TSD]FiPS-4F-3-1 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.

ANEXOS

Anexo 1: Resultado Test de micoplasma (PCR) [TSD]FiPS-4F-3-1

Anexo 2: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia [TSD]FiPS-4F-3-1

Anexo 3: Cariotipo [TSD]FiPS-4F-3-1

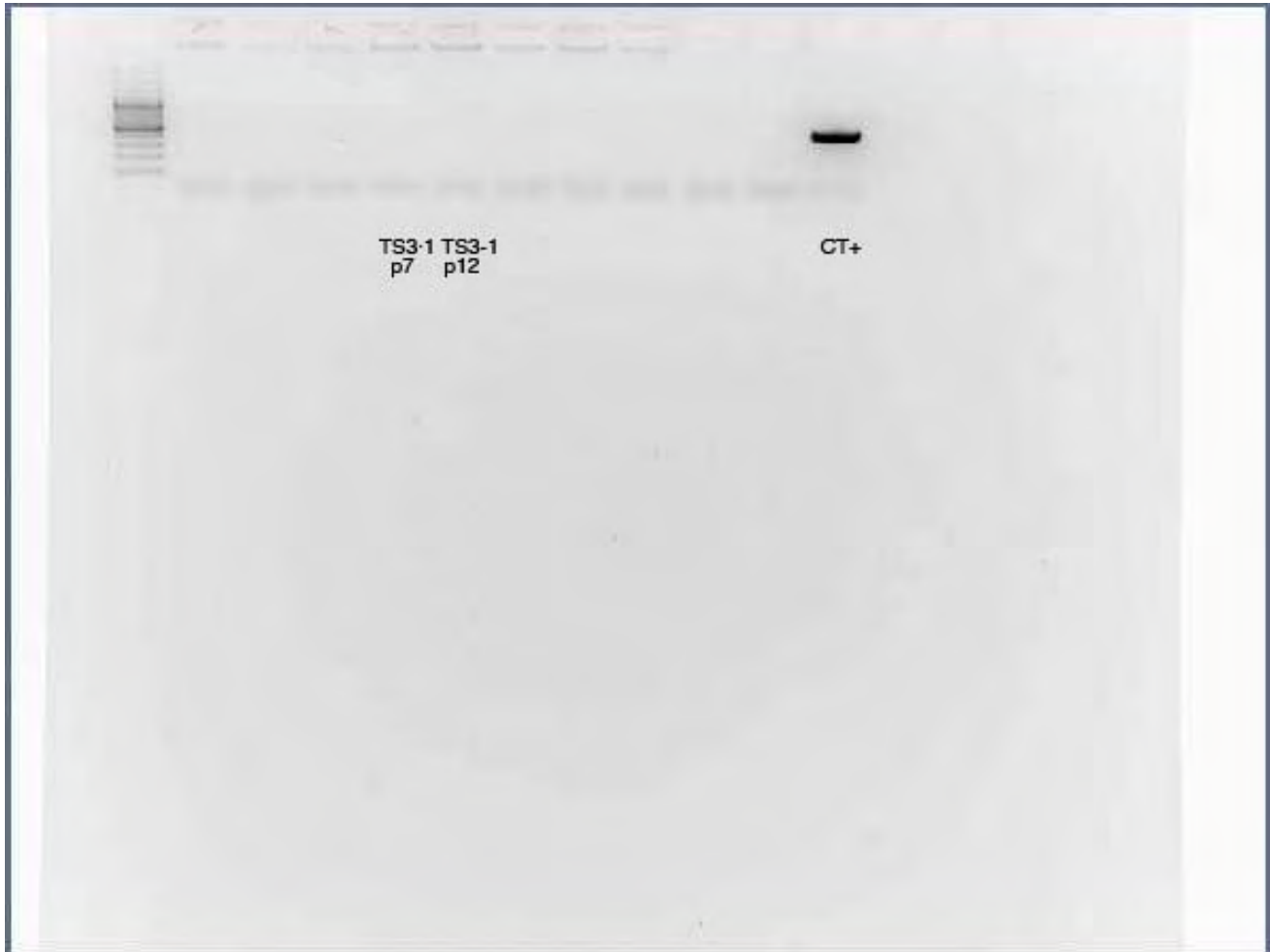
Anexo 4: Diferenciación *in vitro* [TSD]FiPS-4F-3-1

Anexo 5: Diferenciación *in vivo* [TSD]FiPS-4F-3-1

Anexo 6: Genotipación de los fibroblastos originales Coriell; GM00527 y [TSD]FiPS-4F-3-1

Anexo 1

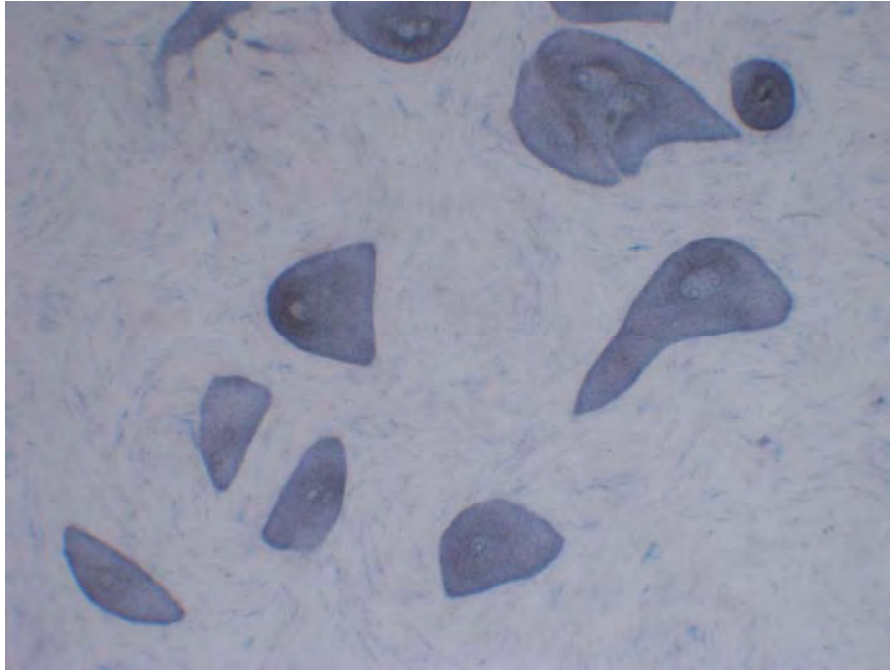
Resultado Test de micoplasma (PCR)



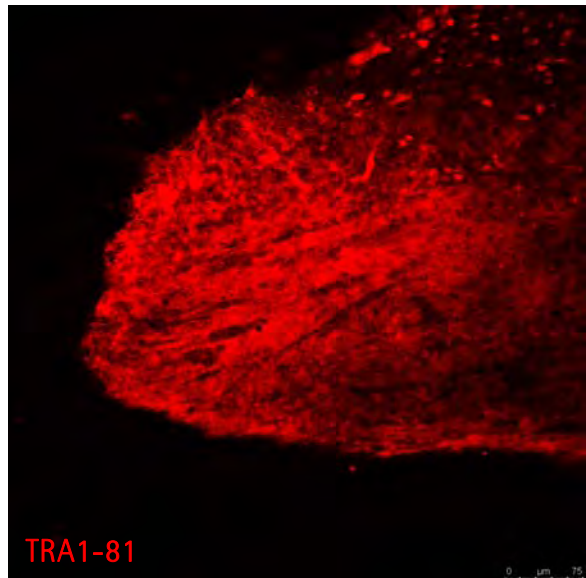
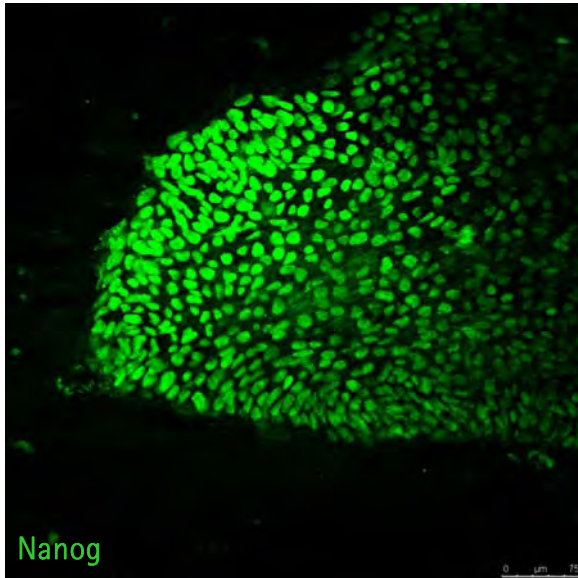
-Resultado test micoplasma [TSD]FiPS-4F-3-1 pase 7 y pase12 postcre: Negativo

Anexo 2

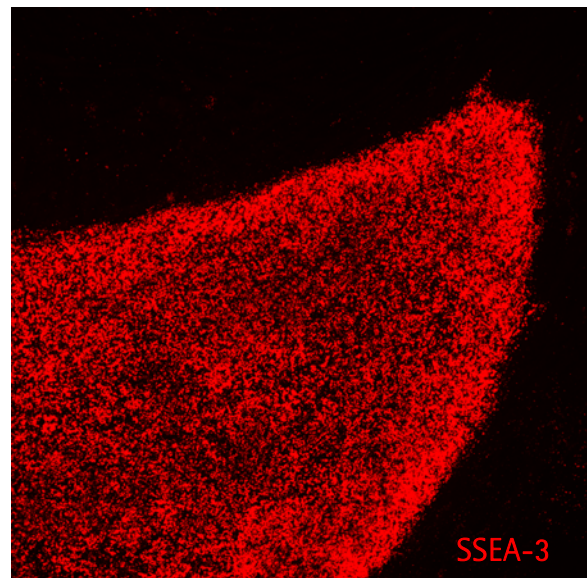
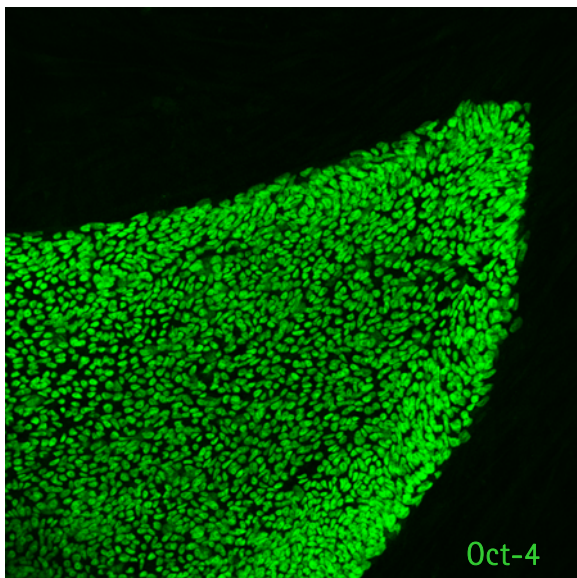
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia [TSD]FiPS-4F-3-1



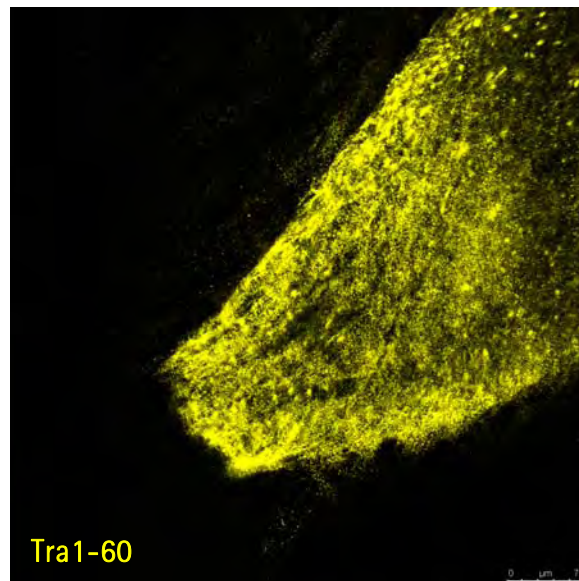
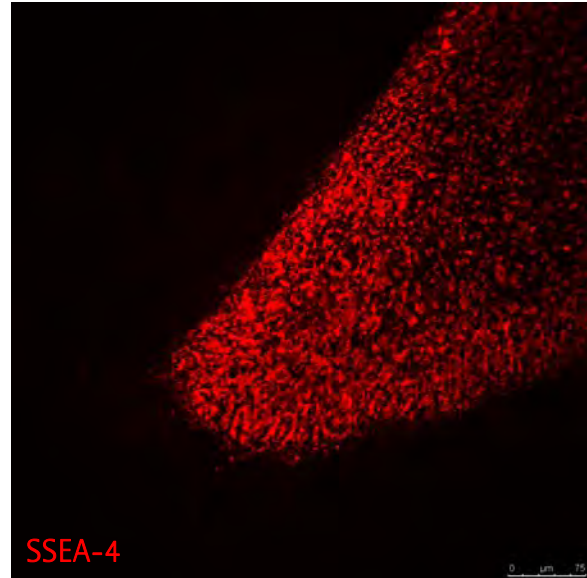
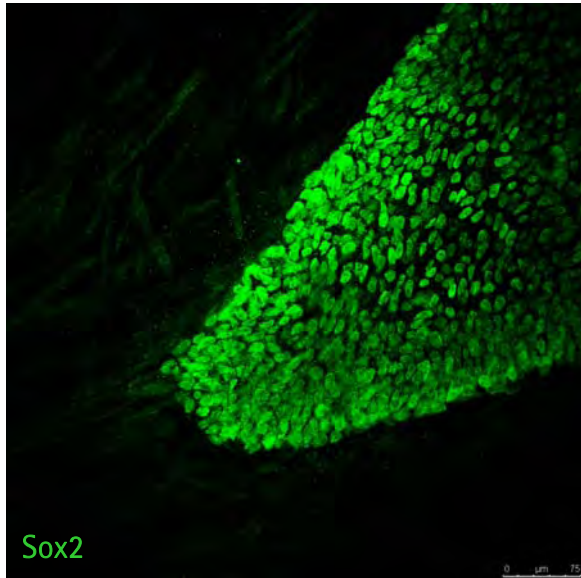
Actividad fosfatasa alcalina de la línea de células pluripotentes [TSD]FiPS-4F-3-1



Immuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [TSD]FiPS-4F-3-1 para Nanog y TRA1-81



Immuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [TSD]FiPS-4F-3-1 para Oct-4



Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [TSD]FiPS-4F-3-1 para Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 3
Cariotipo [TSD]FiPS-4F-3-1

Nombre muestra: **TS FiPS-4F-3-1**

Fecha: Barcelona, 21/11/2013

ESTUDIO CITOGENÉTICO

El resultado obtenido en el estudio citogenético realizado en la muestra **TS FiPS-4F-3-1** es:

-Resultado citogenético: 46, XY

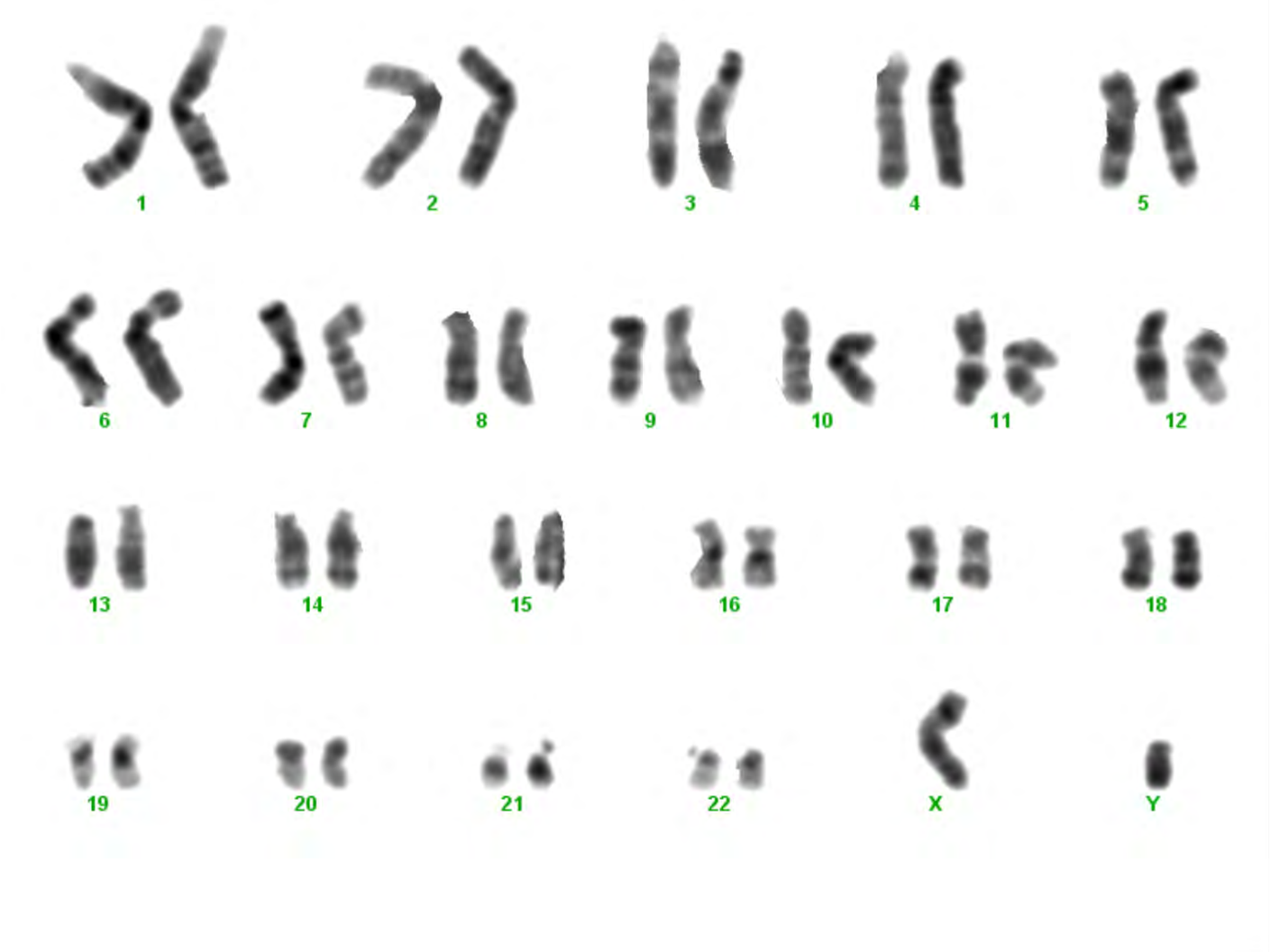
Se han estudiado un total de **20 metafases** procedentes de cultivos celulares de la muestra.

Observaciones:

El resultado citogenético no excluye la presencia de anomalías no detectables debido a limitaciones propias de la técnica, como pueden ser: mosaicos de baja frecuencia y alteraciones estructurales de medida pequeña (microdeleciones y microduplicaciones).

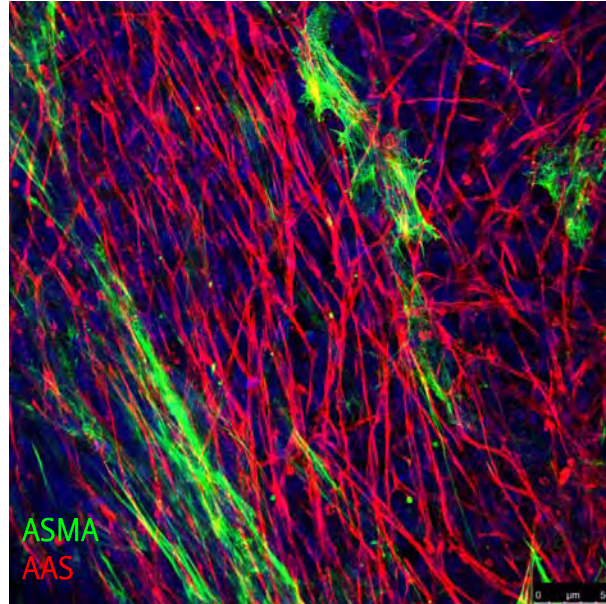
Los estudios citogenéticos tienen una fiabilidad superior al 99%.

Dra. Cristina Gómez Santos

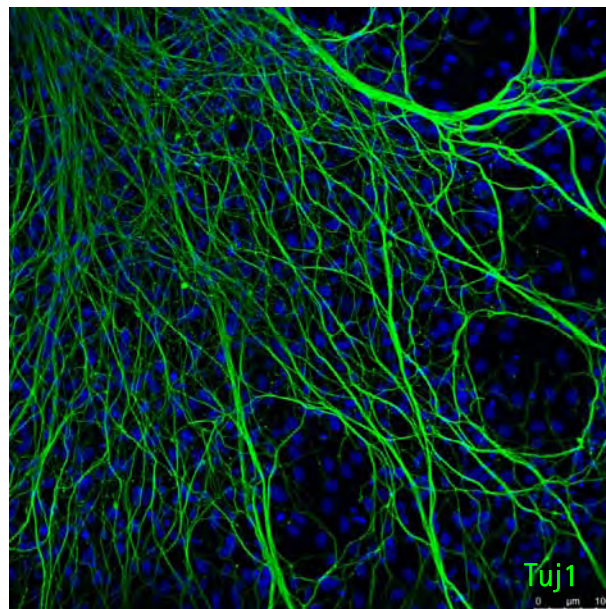


Anexo 4

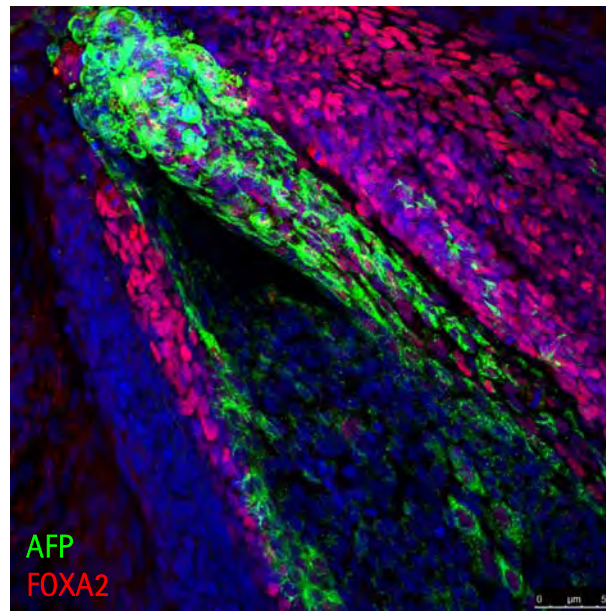
Diferenciación *in vitro* [TSD]FiPS-4F-3-1



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para ASMA y AAS



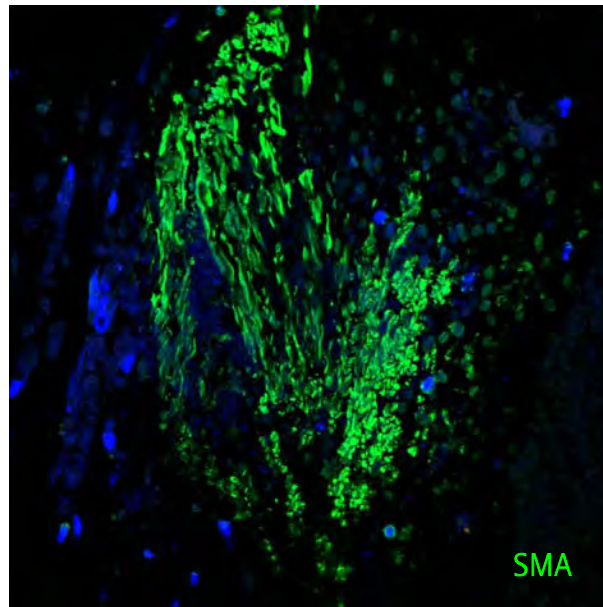
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para Tuj1



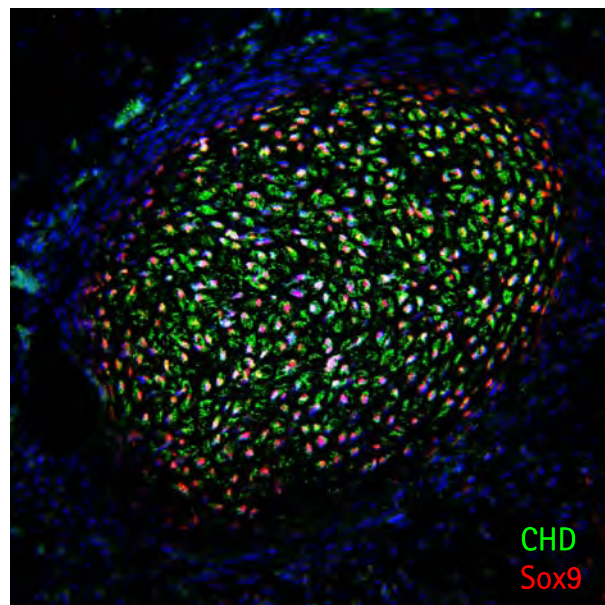
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para AFP y FOXA2

Anexo 5

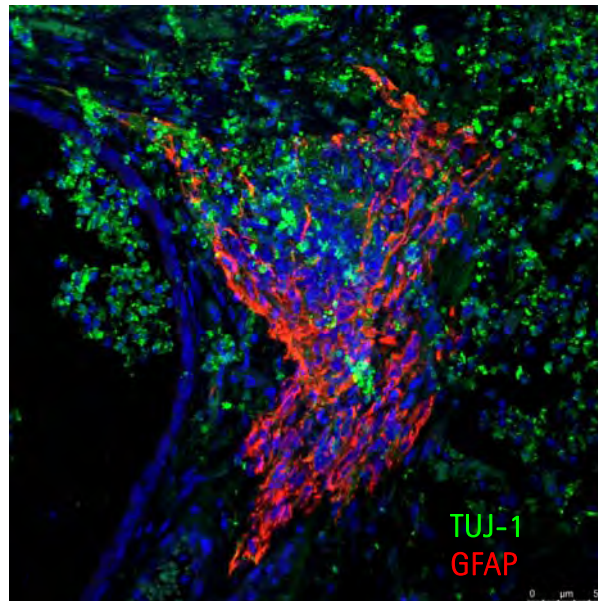
Diferenciación *in vivo* [TSD]FiPS-4F-3-1



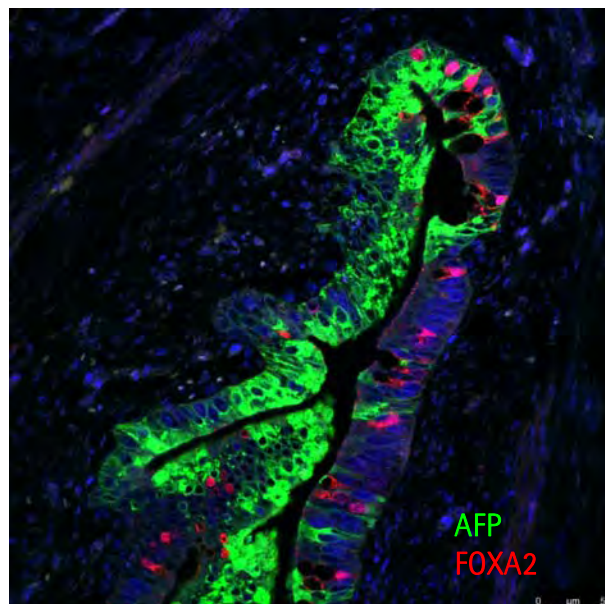
Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para SMA



Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para CHD (chondroitin sulfato) y Sox9



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para TUJ1 y GFAP.



Diferenciación *in vivo* a endodermo: Células positivas para AFPy FOXA2

Anexo 6

Genotipación de los fibroblastos originales Coriell; GM00527 y [TSD]FiPS-4F-3-1

TAY-SACHS FIBROBLASTS GENOTYPING

Sample: Fibroblast TSD, Coriell GM00527

HEXA gene Exon 11 WT

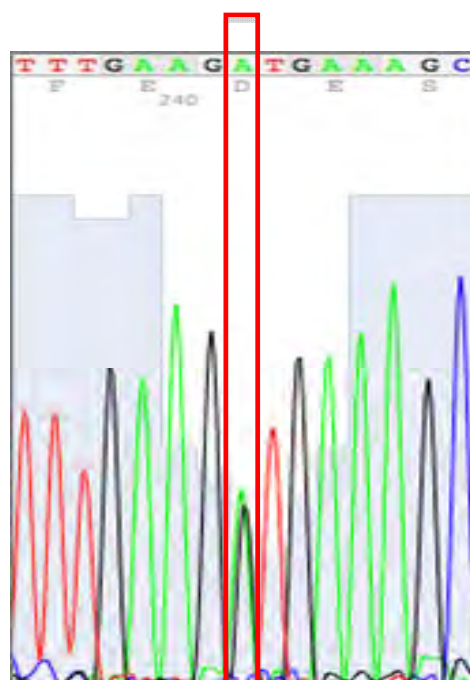
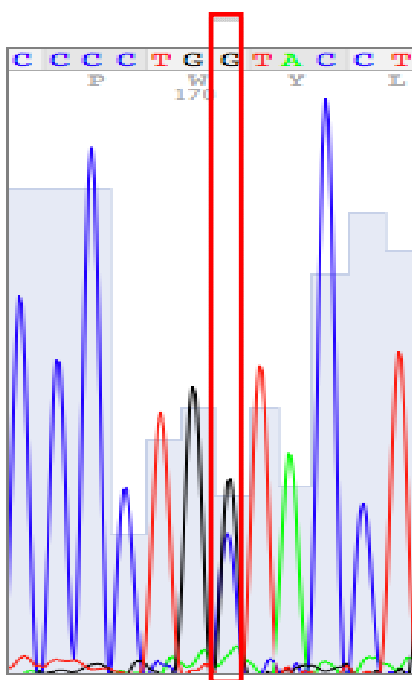
GCAAAAAGCCATCTCCTCAGCTTTGTGTCCTTACTGCCATTTGACCTTTTATAACAGAT
 TCAGCCAGACACAATCATAACAGGTGTGGCGAGAGGATATTCCAGTGAAGTATATGAAG
 GAGCTGGAAGTGGTCACCAAGGCCGGCTTCCGGGCCCTTCTCTCTGCCCCCTG**G**TACCT
 GAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAAGGATTTCTACGTAGTGGAAACCCCTGGCAT
 TTGAAG**G**TGAAAGCAGAGAGCTCTCCTTGCTAACCAAAGGAGGCTGGGTTGGGGCACA
 GGATGGGAGGCAGGAAGGTCTGGGCCAGACATTTCCAGTTAGTAAATGAAACAACCTTA
 GCTGGGGTGAGGGCCACATGGGAGGGATTAGGAGGTACAAATCCGCAAAAACGGTG

HEXA gene Exon 11 TSD

GCAAAAAGCCATCTCCTCAGCTTTGTGTCCTTACTGCCATTTGACCTTTTATAACAGAT
 TCAGCCAGACACAATCATAACAGGTGTGGCGAGAGGATATTCCAGTGAAGTATATGAAG
 GAGCTGGAAGTGGTCACCAAGGCCGGCTTCCGGGCCCTTCTCTCTGCCCCCTG**G/C**TACC
 TGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAAGGATTTCTACGTAGTGGAAACCCCTGGCA
 TTTGAAG**G/A**TGAAAGCAGAGAGCTCTCCTTGCTAACCAAAGGAGGCTGGGTTGGGGC
 ACAGGATGGGAGGCAGGAAGGTCTGGGCCAGACATTTCCAGTTAGTAAATGAAACAAC
 TTAGCTGGGGTGAGGGCCACATGGGAGGGATTAGGAGGTACAAATCCGCAAAAACGGT
 G

Mutation 1: c.1260G>C

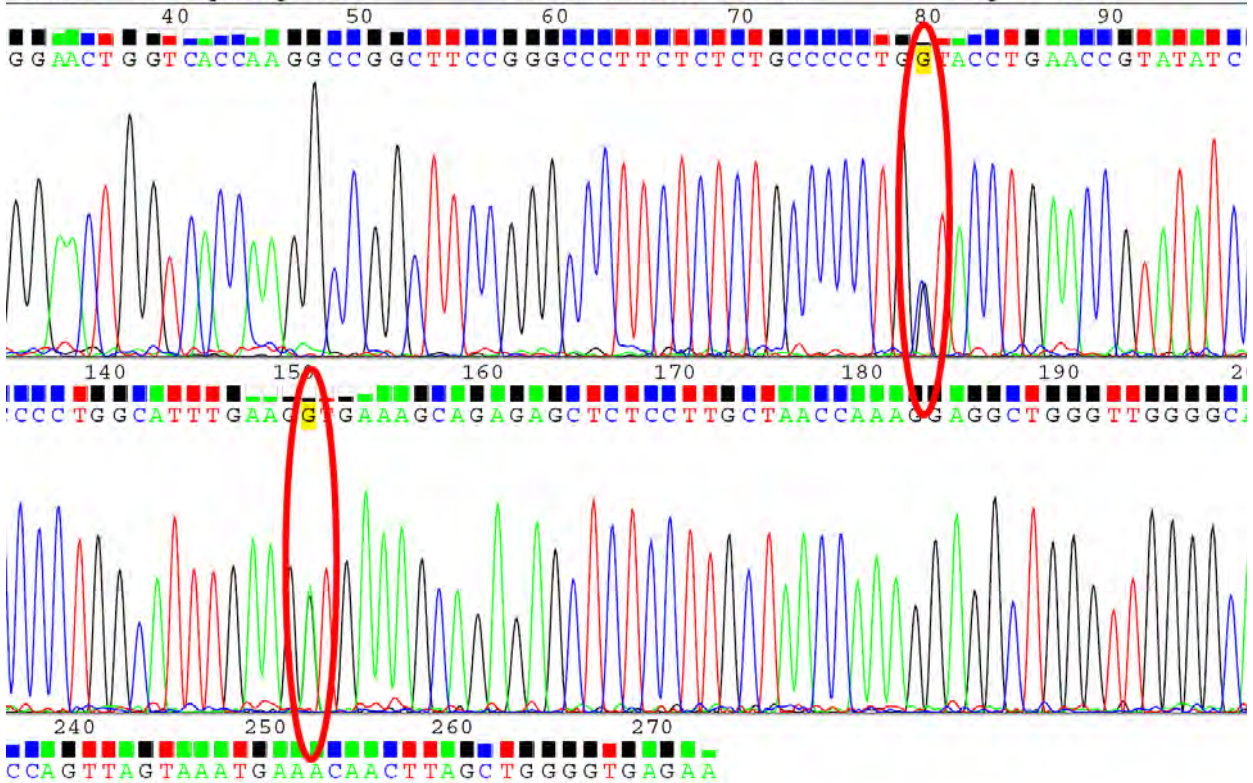
Mutation 2: c.1330+1 G>A



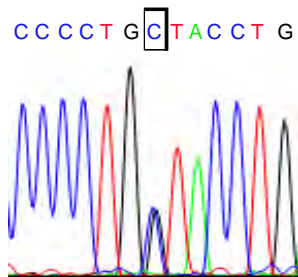
Result: Reverse sequencing. 2 heterozygotic mutations.

GENOTYPING [TSD]-FiPS-4F-3-1

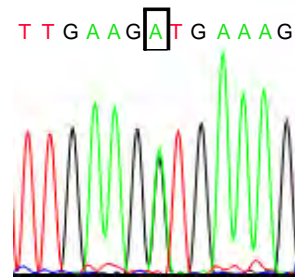
Run Ended: Dec 20, 2012, 12:37:57 Signal G:810 A:829 T:614 C:664 Comment:
 Lane: 5 Base spacing -16.16 272 bases in 16301 scans Page 1 of 2



c.1260 G>C



IVS11+1 G>A



Result:

Compound heterozygote mutation c.1260G> C corresponding to aminoacidic change p.Trp420Cys.
And other allele mutation c.1330 +1 G> A corresponding to splicing IVS11 +1 G> A