

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: FiPS-4F-8

Name of the line: FiPS-4F-8

Investigador principal: Anna Veiga Lluch

Principal Investigator:

Tipo de célula de la que se obtiene la línea:

Cell type origin of the cell line

Fibroblastos de prepucio humano

Fibroblast from human foreskin

¿El sujeto fuente tiene alguna patología?

Has the donor any pathological condition?

NO

No

SÍ (especificar)

Yes (specify)

¿La patología es de origen genético?

Is the pathological condition of genetic origin?

NO

No

SÍ (especificar)

Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

No realizado
(Not carried out)

Cariotipo/Karyotype

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

(pase 12)

(Ver Anexo 4)
(See Annex 4)

SECCIÓN 2

Section 2

Datos del Depositante

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga Lluch	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> Piel de prepucio humano <i>Human foreskin</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 09/02/2009	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 09/02/2009

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), 10 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: Negative
(Mycoplasma: by PCR)

Ver Anexo 5
See Annex 5

Marcadores: ver Anexo 1*Markers: see Annex 1*

	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		+	
Nanog	inmunofluorescencia		+	
Rex 1 (opcional/optional)				
Sox 2	inmunofluorescencia		+	
SSEA3	inmunofluorescencia		+	
SSEA4	inmunofluorescencia		+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia		+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia		+	
Telomerasa/Telomerase (opcional/optional)				
Fosfatasa Alc. /Alkaline phosp.	Actividad		+	
Otros / Others				

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado	marcador	pase	resultado
	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>	<i>marker</i>	<i>passage</i>	<i>result</i>
In Vitro	Tuj-1		+	AFP		+	SMA		+
<i>In vitro</i>			+	FOXA2		+			
<i>(Anexo 2)</i>									
In vivo/ in vivo	<i>(Anexo 3)</i>	Método: formación de teratomas en ratones SCID				Resultado: +			
<i>pase/passage:</i>		<i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>				<i>Result: +</i>			

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

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 2).

Mesoderm: Embryoid 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 2).

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 $4 \cdot 10^6$ de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo. (ver Anexo 3).

Clumps of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. 8 weeks later teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (see Annex 3).

Datos de la tipificación HLA*HLA typification data*

No realizado

*(Not carried out)***Integración de los transgenes de reprogramación: qPCR para integración de provirus***Integration of reprogramming transgenes: qPCR for provirus integration*

La qPCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc

qPCR showed the integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc

*(See annex 6)***Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR***Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR*

Se evidenció el silenciamiento de los 4 genes de reprogramación: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc

Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc has been shown

*(See annex 6)***Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases***Long-term maintenance in culture: >20 passages*

La línea se ha mantenido en cultivo durante 23 pases

The line has been cultured during 23 passages

Pase en el momento del registro*Passage at the time of the recording*

p23

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?*Has the line been genetically modified?*Sí Yes No No **Comentarios/ Comments:****¿Se llevó a cabo un análisis clonal?***Has a clonal analysis been carried out?*Sí/ Yes No **Resultado / Result**

Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):

Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

Constructos y producción retroviral

Constructs and retroviral production

Se ha producido la línea de células iPS usando una infección retroviral con los siguientes factores de transcripción: Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc. Vector utilizado pMSCV modificado que permite la expresión de proteínas FLAG_tagged N-terminal.

We have produced this iPS cell line using a retroviral infection with the selected transcription factors: Oct-4, Sox2, Klf-4 and c-Myc. Vector used: pMSCV that allows the expression of N-terminal FLAG-tagged proteins

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

Confirmando 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.

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)</p> <p> CMR[B] Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centre of Regenerative Medicine in Barcelona</p> <p>Fecha/ Date: 4/2/2015</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p> <p></p> <p>Fecha/ Date: 4/2/2015</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Margarita Sala Azón, Gerente</p>	
<p>Dirección Postal: Postal Address:</p> <p>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88 08003. Barcelona</p>	<p>Teléfono / Telephone: +34 93 316 03 00</p> <p>Fax: +34 93 316 03 01</p> <p>E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR FiPS-4F-8 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia **FiPS-4F-8**

Anexo 2: Diferenciación *in vitro* **FiPS-4F-8**

Anexo 3: Diferenciación *in vivo* **FiPS-4F-8**

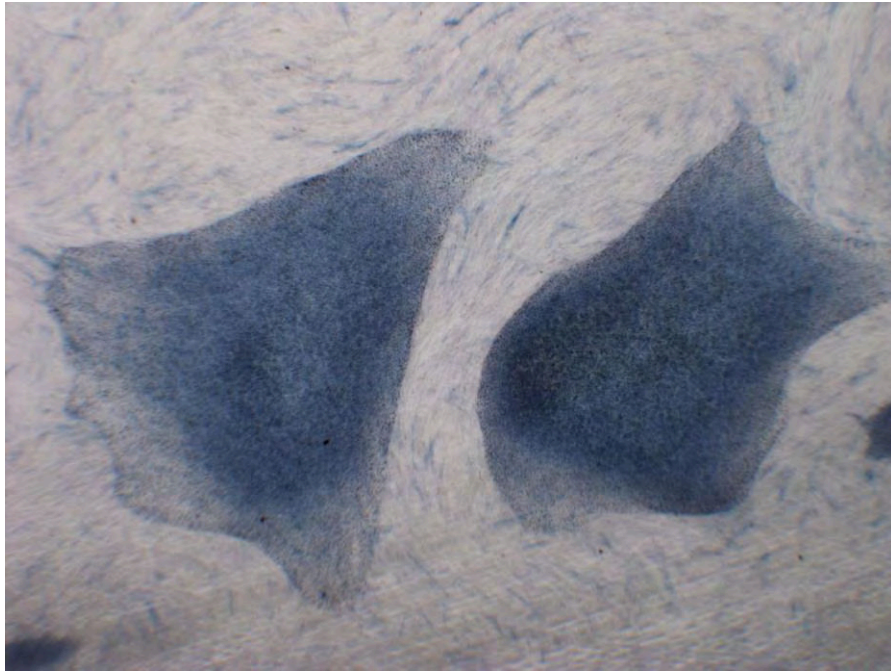
Anexo 4: Cariotipo **FiPS-4F-8**

Anexo 5: Resultado Test de mycoplasma (PCR) **FiPS-4F-8**

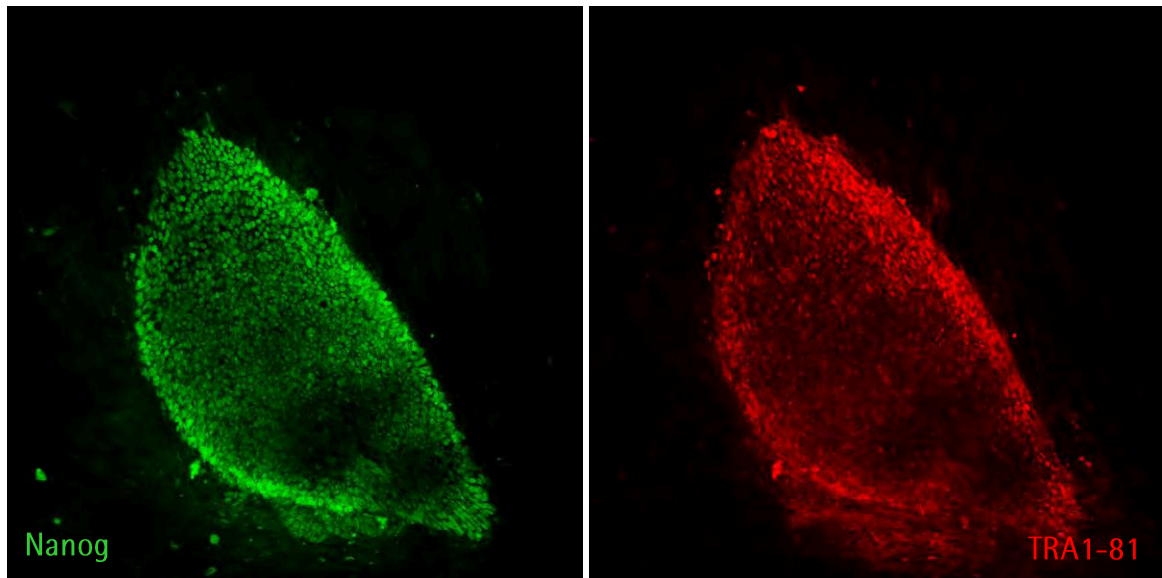
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación **FiPS-4F-8**

Anexo 1

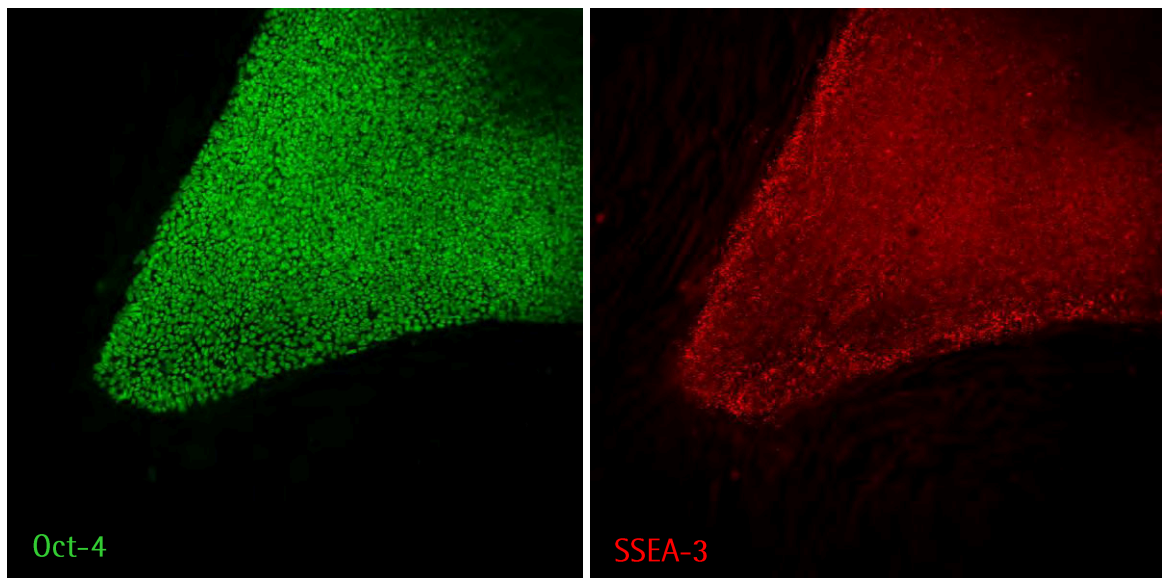
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia FiPS-4F-8



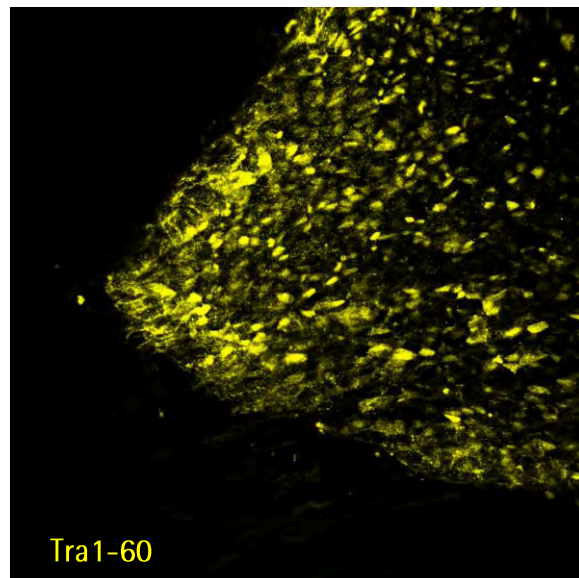
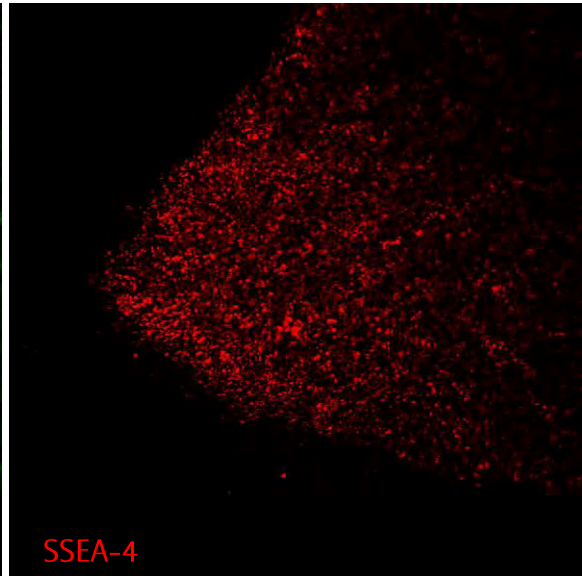
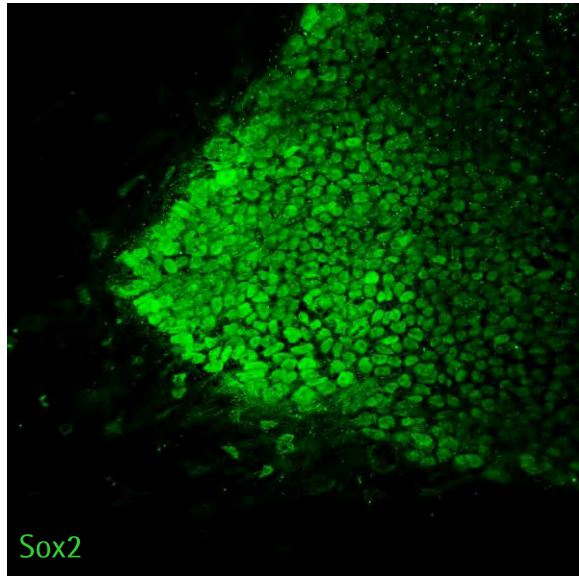
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes **FIPS-4F-8**



Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes **FIPS-4F-8** para **Nanog** y **TRA1-81**



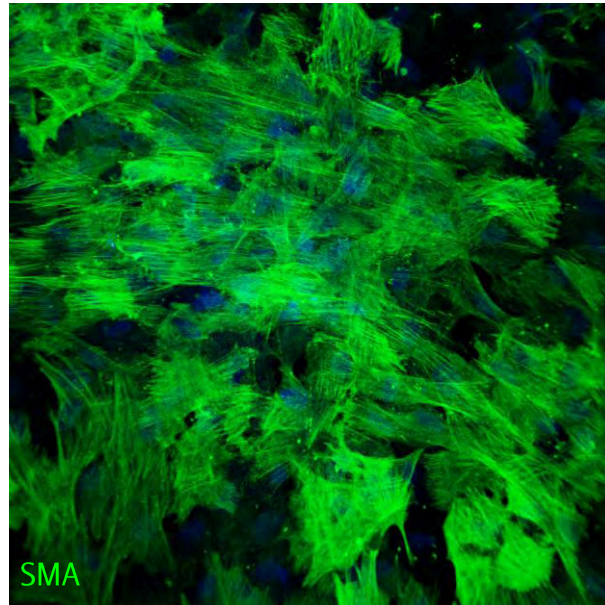
Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes **FIPS-4F-8** para **Oct-4** y **SSEA-3**



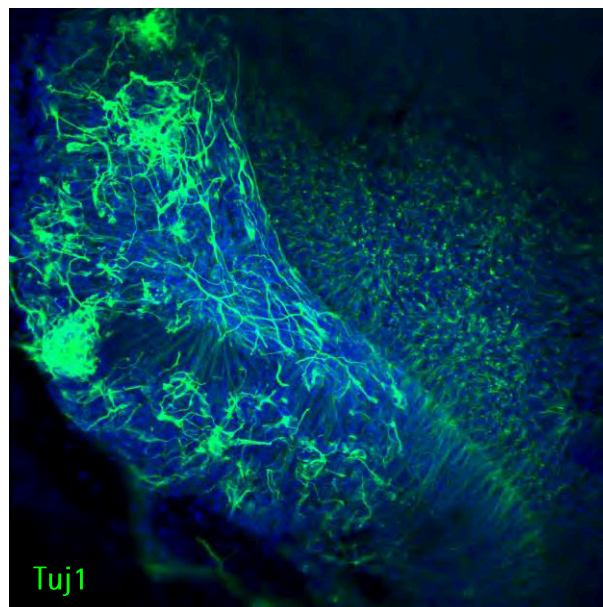
Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes **FiPS-4F-8** para **Sox-2**, **SSEA-4** y **TRA1-60**

Anexo 2

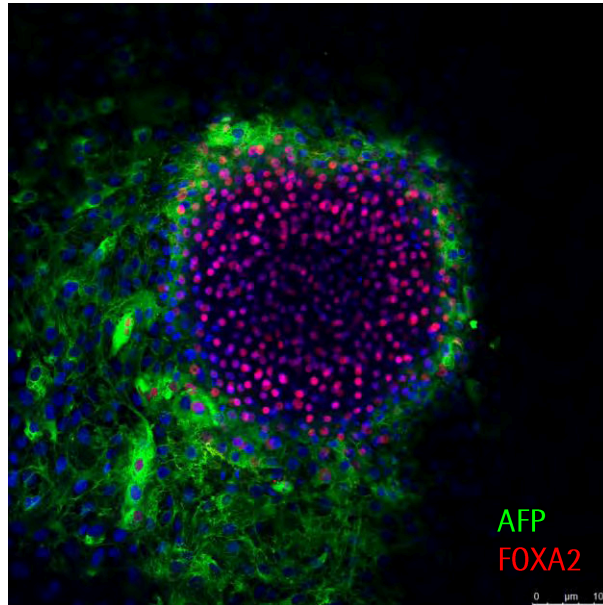
Diferenciación *in vitro* FiPS-4F-8



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



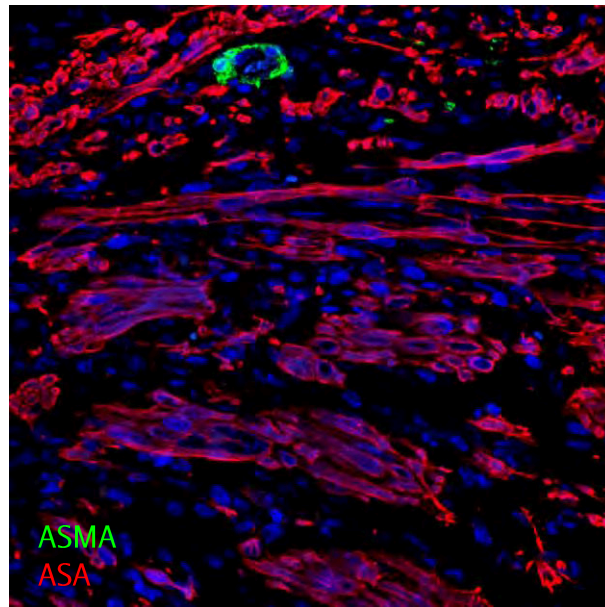
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**



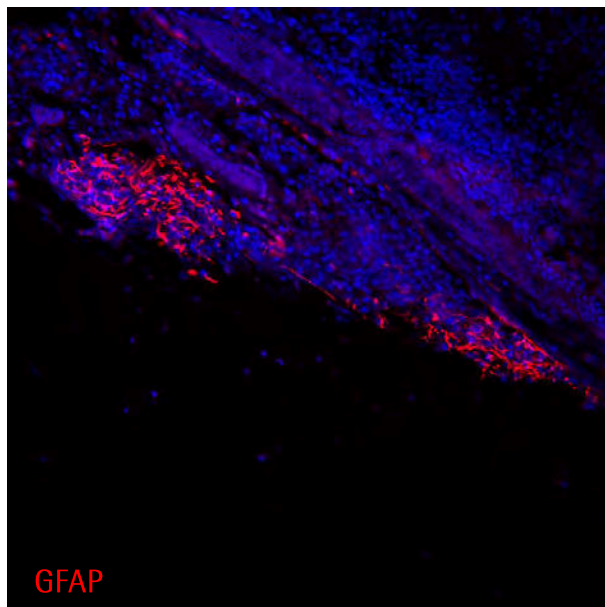
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 3

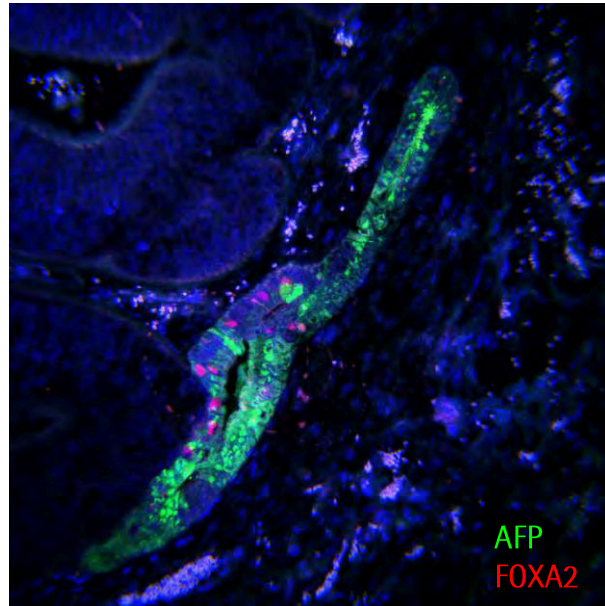
Diferenciación *in vivo* FiPS-4F-8



Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para **ASMA y ASA**



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



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



Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 4

Cariotipo FiPS-4F-8

Fips 4F#8

Fips 4F#8

Data d'entrada: 07/05/2014

ESTUDI CITOGENÈTIC

El resultat obtingut en l'estudi citogenètic fet a la mostra de cèl·lules mare rebuda amb aquest nom és:

- Resultat citogenètic: 46,XY

Comentari:

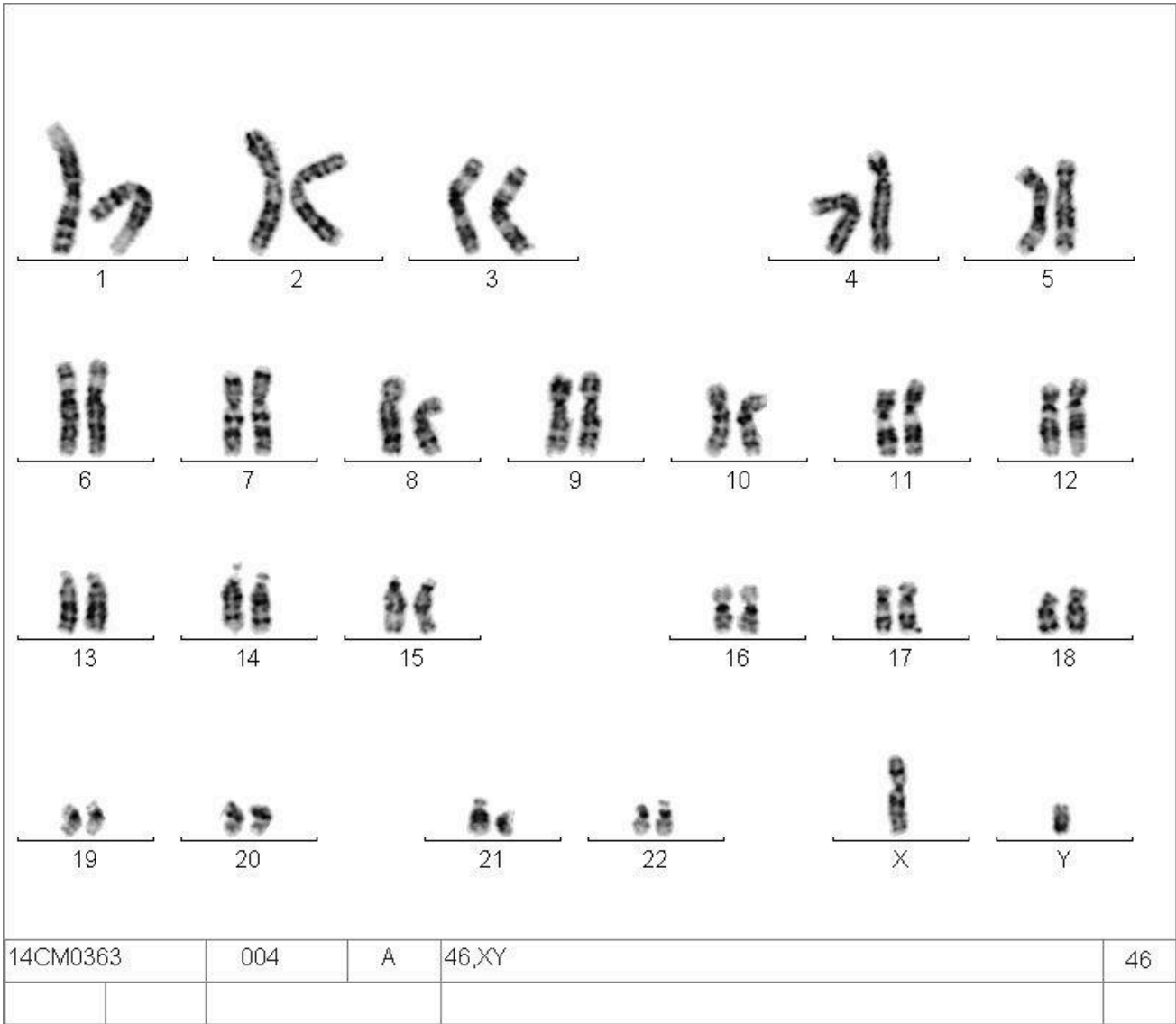
En l'estudi citogenètic realitzat mitjançant la tècnica de bandes G amb 150bjh no s'ha observat cap alteració cromosòmica. S'ha estudiat un total de 15 metafases procedents dels cultius cel·lulars de la mostra.

Observacions:

El resultat citogenètic no exclou la presència d'anomalies no detectables per les limitacions pròpies de la tècnica, com poden ser: contaminació materna, mosaics de baixa freqüència i alteracions estructurals mínimes (microdeleccions i microduplicacions). Les troballes que s'interpreten com a variants de la normalitat cromosòmica no es reflecteixen en el resultat citogenètic. Els estudis citogenètics tenen una fiabilitat superior al 99%.

Barcelona, 09/05/2014

Dr. A. Serés Santamaría
Genetista clínic



Anexo 5

Resultado Test de mycoplasma (PCR)

Mycoplasma

FiPS4F-8

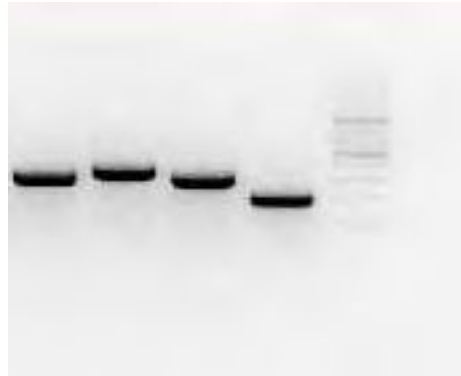


Anexo 6

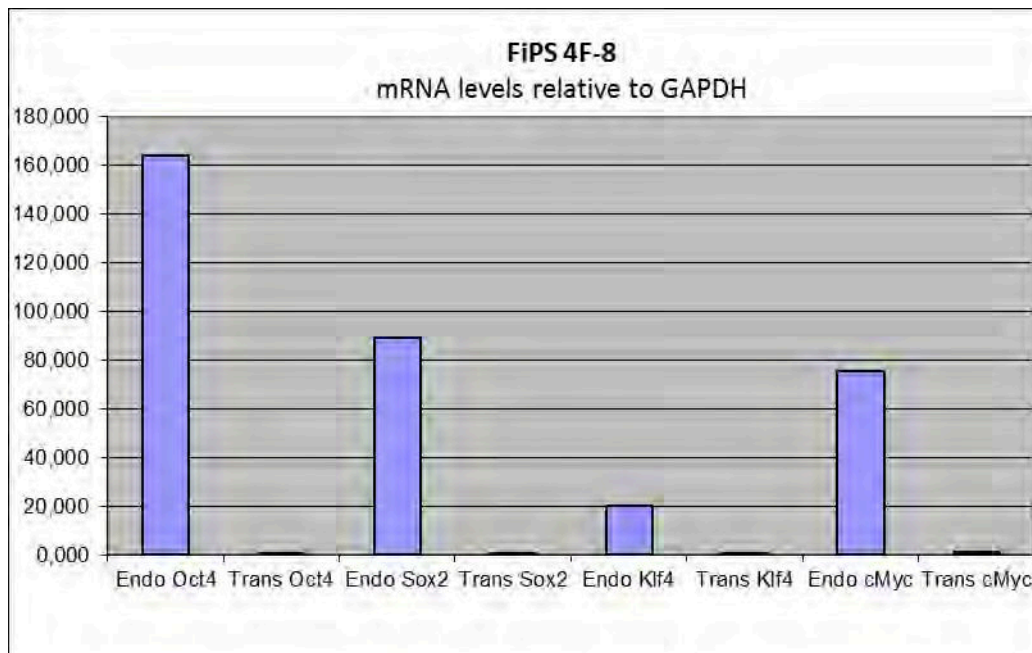
Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Integration FiPS4F-8

Oct4 Sox2 Klf4 cMyc



Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los 4 genes utilizados Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc para generar la línea FiPS-4F-8



Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH