

# 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:*

[PD] FiPS022-V4F-15

#### Investigador principal:

*Principal Investigator: Leopoldo Laricchia-Robbio*

#### Tipo de célula de la que se obtiene la línea:

*Cell type origin of the cell line*

Fibroblastos de dermis humanos

*Human dermal fibroblasts*

#### ¿El sujeto fuente tiene alguna patología?

*Has the donor any pathological condition?*

NO       SÍ  (especificar) Enfermedad de Parkinson  
No                      Yes (specify) Parkinson's Disease

#### ¿La patología es de origen genético?

*Is the pathological condition of genetic origin?*

NO       SÍ  (especificar) **Mutation:** LRRK2 G2019S heterozygote with early onset  
No                      Yes (specify) PD (40 aa) Mutation confirmed by sequencing (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

*Analysis of STR markers***Cariotipo/Karyotype**

**Euploide/Euploid**       **Anormal/Atypical**       (especificar/specify)  
 46, XY t(6, 12)

Comentario: Los fibroblastos del paciente presentan también la translocaciónComment: Fibroblasts from the patient also carry the translocation**SECCIÓN 2***Section 2***Datos del Depositante***Applicant Details*

<b>Investigador Principal:</b> <i>Principal Investigator:</i> Leopoldo Laricchia-Robbio	<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal address:</i> Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
<b>Centro de Trabajo:</b> <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	<b>Teléfono (phone):</b> 93 3160360 <b>Fax:</b> 93 3160303 <b>E-mail:</b> csr@cmrb.eu

**SECCIÓN 3***Section 3***Datos de la Línea Celular***Details of Cell Line*

<b>Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica</b> <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> <i>Biopsia de piel</i> <i>Skin Biopsy</i>	
<b>Muestra biológica</b> <i>Biological sample</i> Fibroblast from Telethon Biobank (FFF-022 / FFF0962009)	
<p style="text-align: center;"> <b>Fresco</b> <input type="checkbox"/>      <b>Crioconservado</b> <input checked="" type="checkbox"/>  <i>Fresh</i>      <i>Cryopreserved</i> </p>	
<b>Fecha de la donación del muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> 1.12.2010	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 15.12.2010



**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, CCD112Sk).  
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)*

(Anexo 1)

**Bacteriología Negativo**

*(Bacteriology) Negative*

**Micología Negativo**

*(Mycology) Negative*

**Micoplasma: PCR Negativo**

*(Mycoplasma: by PCR) Negative*

**Marcadores:***Markers*

(Anexo2)

	<b>Método</b> <b>(ARN/proteínas)</b>	<b>nº pase</b>	<b>resultado</b>	<b>comentarios</b>
	<i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	<i>Passage n.</i>	<i>results</i>	<i>comments</i>
<b>Oct 4</b>	inmunofluorescencia	p3	+	
<b>Nanog</b>	inmunofluorescencia	p3	+	
<b>Rex 1 (opcional/optional)</b>				
<b>Sox 2</b>	inmunofluorescencia	p3	+	
<b>SSEA3</b>				
<b>SSEA4</b>	inmunofluorescencia	p3	+	
<b>TRA-1-60</b>	inmunofluorescencia	p3	+	
<b>TRA-1-81</b>	inmunofluorescencia	p3	+	
<b>Telomerasa/Telomerase (opcional/optional)</b>				
<b>Fosfatasa Alc./Alkaline phosphatase</b>		p21	+	
<b>Otros / Other</b>				

**Capacidad de diferenciación***Differentiation capacity*

	<b>Ectodermo/ Ectoderm</b>			<b>Endodermo/Endoderm</b>			<b>Mesodermo/ Mesoderm</b>		
	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>	<b>marcador</b>	<b>pase</b>	<b>resultado</b>
	<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>
<b>In Vitro</b>	Tuj-1	p6	+	AFP	p6	+	Gata-4	p6	+
<i>In vitro</i>				Foxa2		+	AAS		+
(Anexo 4)									

**In vivo/ in vivo****pase/passage: 10**

(Anexo 5)

**Método: Formación de teratomas en ratones SCID***Method: Teratoma formation in SCID mice***Resultado: +***Result: +***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 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 5).*

**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 6).*

**Datos de la tipificación HLA** No realizado*HLA typification data Not carried out*

Se realiza análisis de marcadores STR

*Analysis of STR markers***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; OCT4, SOX2, KLF4 y c-myc.  
*qPCR showed the integration of the 4 genes; OCT4, SOX2 and KLF4 and c-myc*

**Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR***Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR*

Por qRT-PCR. Transgenes silenciados

*By qRT-PCR. Transgenes are silenced***Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases***Long-term maintenance in culture: >20 passages*

La línea se ha mantenido en cultivo durante 22 pases.

*The line has been culture during 22 passages***Pase en el momento del registro***Passage at the time of the recording*

Pase 22

*Passage 22***¿Ha sido la línea modificada genéticamente?***Has the line been genetically modified?*Sí Yes No No **¿Se llevó a cabo un análisis clonal?***Has a clonal analysis been carried out?*Sí/ Yes  No **Resultado / Result****Comentarios/ Comments:**



**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**

Los cDNA humanos KLF4, SOX2 y c-MYC-T58A y de ratón OCT4 se amplificaron a partir de RNA total por RT-PCR. Los cDNA amplificados a partir de KLF4, SOX2 y c-MYC-T58A se clonaron en un vector modificado pMSCV puro que permite la expresión de N-terminal marcado con Proteína FLAG. El cDNA de Oct-4 fue clonado en un vector modificado pMXs expresando N-terminal FLAG-Oct4-VP16-Orange. Los retrovirus de los cuatro factores fueron producidos independientemente después de la transfección de la línea celular Phoenix Amphotropic, utilizando Fugene 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, se cambió el medio y las células fueron incubadas a 32°C. Los sobrenadantes fueron recogidos tras 24 y 48 horas. Los sobrenadantes fueron filtrados (0,45µm poresize) y se añadió polibreno (5µg/ml).

**Reprogramación de las células de Parkinson**

24 horas antes de la infección, los fibroblastos fueron sembrados ( $1 \times 10^5$  cels/pocillo de placas de 6 pocillos). Las células fueron infectadas mediante la infección por centrifugación durante 45 minutos a 750g a 32°C, aplicando una mezcla de sobrenadantes retrovirales a partir de los 4 factores. Después de 24hs, se realiza una segunda infección. Tras 48 horas, las células fueron tripsinizadas y sembradas sobre fibroblastos humanos irradiados en hES media. Tras obtener células PD FiPS, estas fueron cultivadas sobre matrigel o sobre fibroblastos irradiados y picadas mecánicamente.

**Constructs and retroviral production**

KLF4, SOX2, and c-MYC-T58A human cDNAs and OCT4 mouse cDNA were amplified from total RNA by RT-PCR. The amplified cDNAs from KLF4, SOX2 and c-MYC-T58A were cloned into a modified pMSCVpuro vector that allows the expression of N-terminal FLAG-tagged proteins. The cDNA from Oct4 was cloned into a modified pMXs vector expressing N-terminal FLAG-Oct4-VP16-Orange. VP16 is an activator domain from Herpes simplex virus inducing potent gene activation. Retroviruses for the four factors were independently produced after transfecting Phoenix Amphotropic cell line using Fugene 6 according to manufacturer's directions. 24 hours after transfection, the medium was replaced, cells were incubated at 32°C, and viral supernatant was harvested after 24h and 48h. The retroviral supernatants were sterile filtrated (0,45µm poresize) and polybrene (5µg/ml) was added.

**Reprogramming of Parkinson cells**

24h before infection, patients fibroblasts were seeded ( $1 \times 10^5$  cells/1well of 6well plate). Cells were infected by spin infection for 45min at 750g at 32°C applying a mixture of retroviral supernatant from the four factors. After 24h a second spin infection was performed and after 48h the cells were splitted on irradiated human fibroblasts in hES medium. PD FiPS were cultured on irradiated human fibroblasts or on matrigel and picked mechanically.

**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><b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b>                  (Representante legal del Departamento/Centro)                  (Legal Representative of the Department/Centre)</p> <p><b>CMR[B]</b></p> <p><small>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona                  Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona                  Center of Regenerative Medicine of Barcelona</small></p> <p>Fecha/Date: 15/04/2013</p> <p><small>Dr. Aiguader, 88</small></p>	<p><b>Firma del Investigador Principal</b>                  Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha /Date 15/04/2013</p>
<p><b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b>                  Name and Position of the Person Representing the Centre:</p> <p>Miguel Gómez Clares                  Gerente</p>	
<p><b>Dirección Postal:</b>                  Postal Address:</p> <p>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona                  Dr. Aiguader, 88                  08003 Barcelona</p>	<p><b>Teléfono /Telephone:</b> 933160303</p> <p><b>Fax:</b> 933160301</p> <p><b>E-mail:</b> gerencia@cmrb.eu</p>

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA  
LÍNEA CELULAR [PD]FiPS022-V4F-15 EN EL  
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.



## ANEXOS

Anexo 1: Informe independiente del análisis microbiológico  
[PD]FiPS022-V4F-15

Anexo 2: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia [PD]FiPS022-V4F-15

Anexo 3: Cariotipo [PD]FiPS022-V4F-15

Anexo 4: Diferenciación *in vitro* [PD]FiPS022-V4F-15

Anexo 5: Diferenciación *in vivo* [PD]FiPS022-V4F-15

Anexo 6: Genotipación de la línea [PD]FiPS022-V4F-15



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

## Anexo 1

### Informe independiente del análisis microbiológico

[PD]FiPS022-V4F-15

Peticció : 88929  
NO INDUSTRIA  
MUTUA

H: //GL59184298

C. MEDICINA REGENERATIVA DE BA  
D.N.I. :  
Edat : T.F.: Global  
Data extracció : 06-11-12

[PD] FiPS022 V4F-15, p15

[PD] FiPS022 V4F-15 p15

## MYCOPLASMES/UREAPLASMES UROGENITALS : CULTIU EN MOSTRA

Mostra : MOSTRA

RESULTAT ..... No s'observa creixement

### CULTIU

Tècnica : Cultiu en medis de enriquiment i selectius.

MOSTRA : MOSTRA

RESULTAT ..... No s'observa creixement

### CULTIU MICOLÒGIC

MEDI D'AÏLLAMENT I CULTIU : Agar Sabouraud amb Gentamicina i Cloranfenicol.

MOSTRA : MOSTRA

RESULTAT ..... No s'observa creixement

Responsables de Validació : AUTO, NMB.

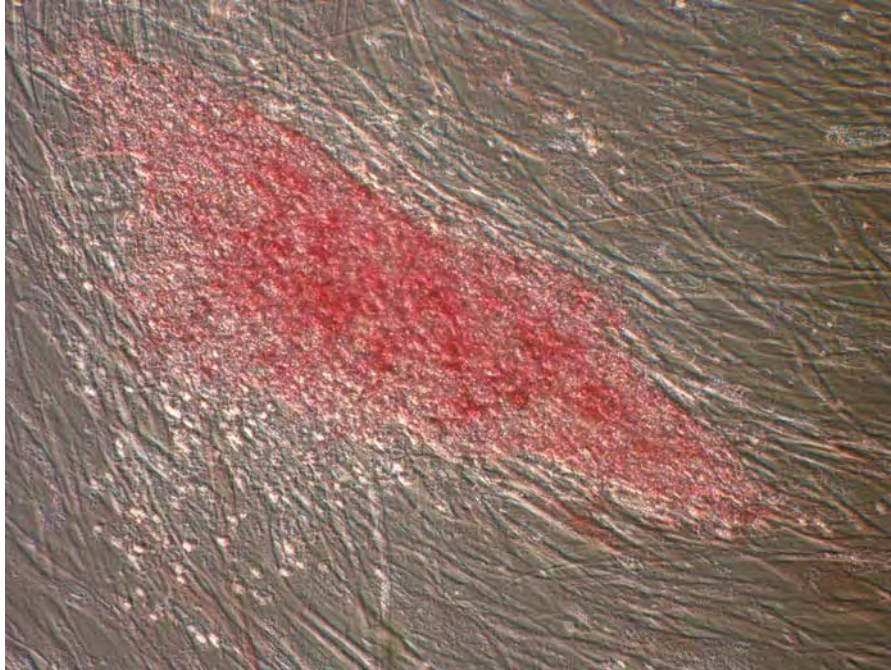
Director : Dr. J.I. HORNOS I VILA

Barcelona, 28 de novembre de 2012

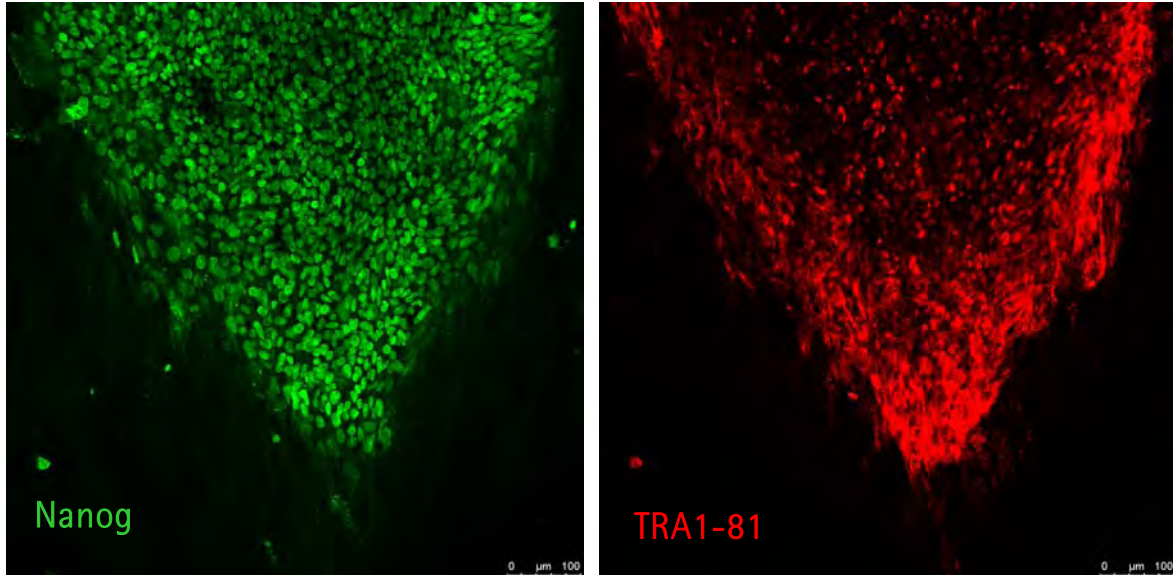


## Anexo 2

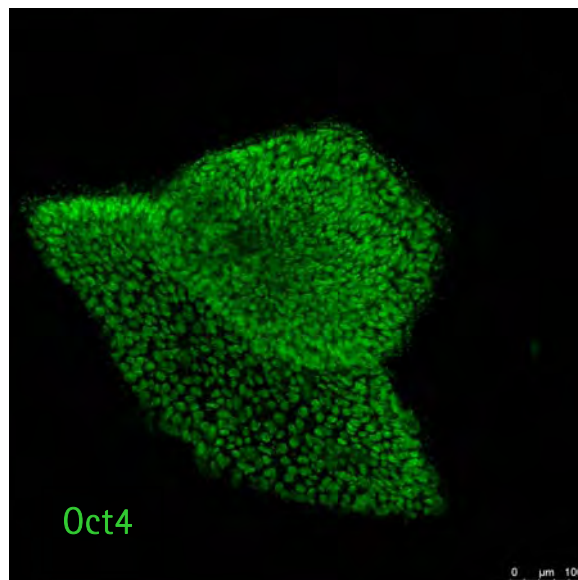
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia [PD]FiPS022-V4F-15



Actividad fosfatasa alcalina de la línea de células pluripotentes [PD]FiPS022-V4F-15

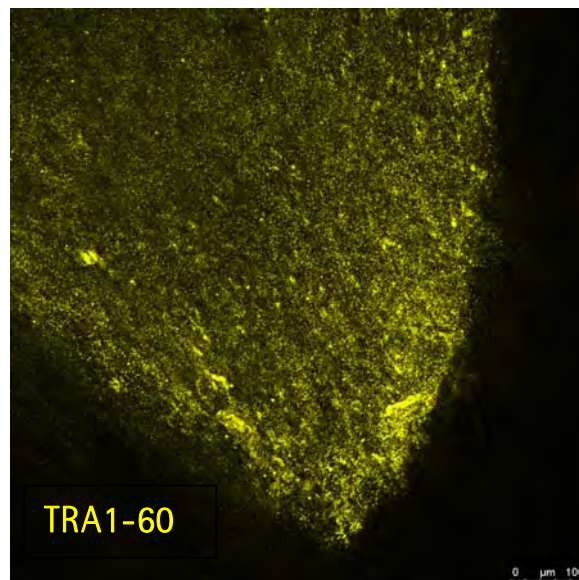
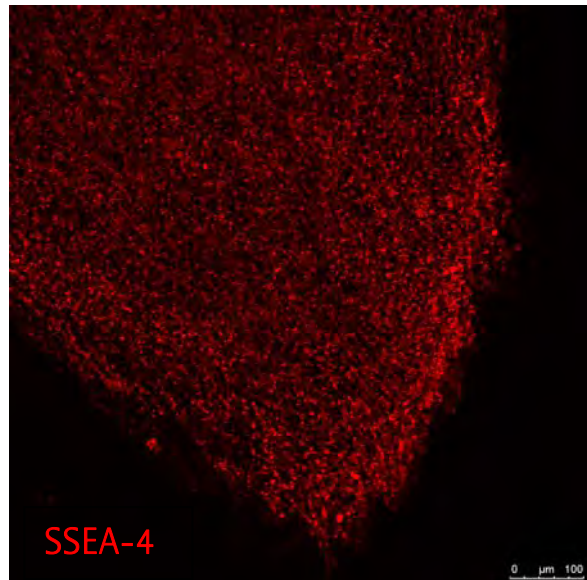
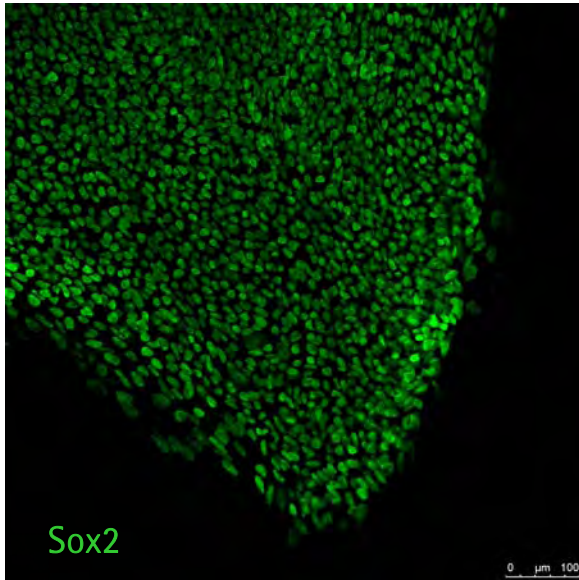


Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [PD]FiPS022-V4F-15 para Nanog y TRA1-81



Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [PD]FiPS022-V4F-15 para Oct-4





Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes [PD]FiPS022-V4F-15 para Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 3  
Cariotipo [PD]FiPS022-V4F-15

Nombre muestra: [PD]FiPS022-V4F-15

Fecha: Barcelona, 14/04/2013

**ESTUDIO CITOGENÉTICO**

El resultado obtenido en el estudio citogenético realizado en la muestra [PD]FiPS022-V4F-15 es:

**-Resultado citogenético: 46, XY, t(6;12)**

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

Comentario:

En el estudio citogenético realizado mediante la técnica de bandas G con 150bjh se ha observado una translocación balanceada entre los cromosomas 6 y 12, observándose en el 100% de las metafases analizadas.

Observaciones:

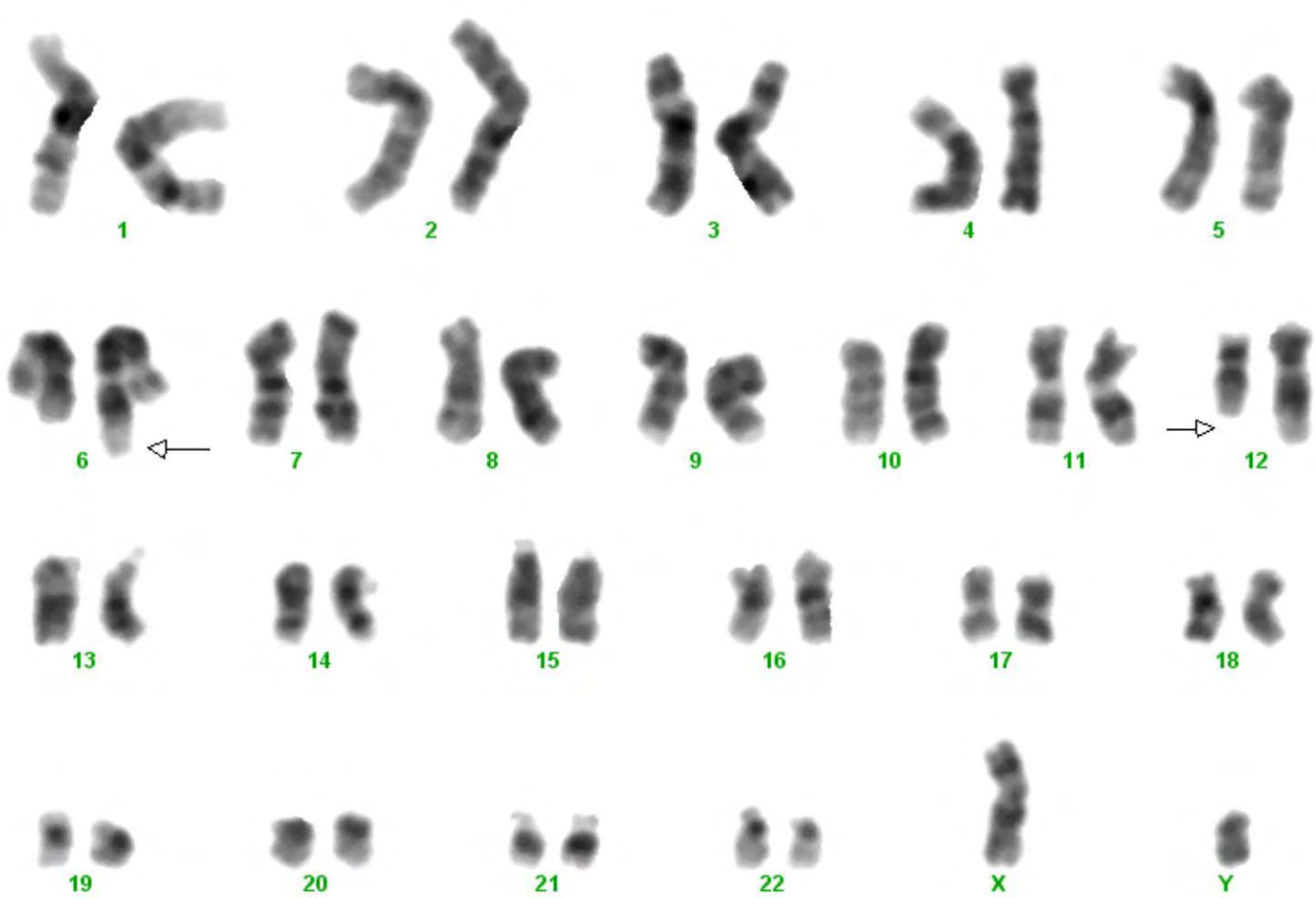
El resultado citogenético no excluye la presencia de anomalías no detectables debido a limitaciones propias de la técnica, como pueden ser: mosaicos de baja frecuencia y alteraciones estructurales de medida pequeña (microdeleciones y microduplicaciones).

Los estudios citogenéticos tienen una fiabilidad superior al 99%.



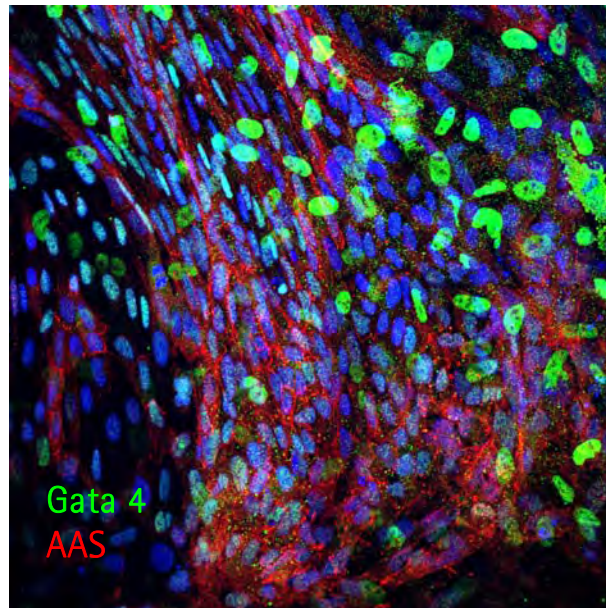
Dra. Cristina Gómez Santos



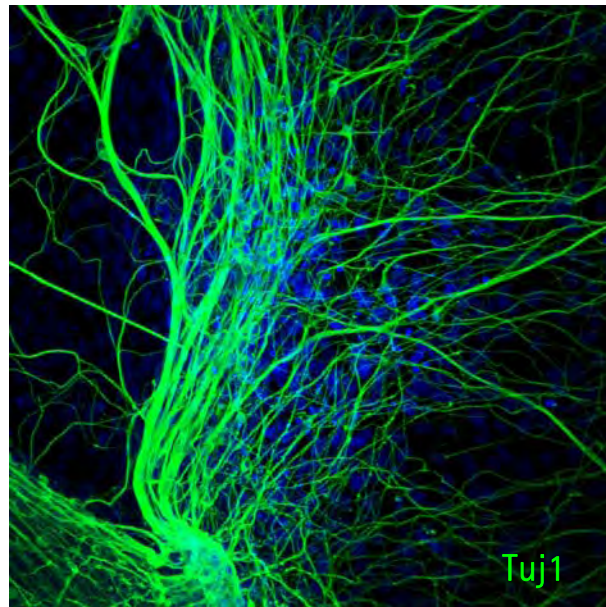


## Anexo 4

### Diferenciación *in vitro* [PD]FiPS022-V4F-15

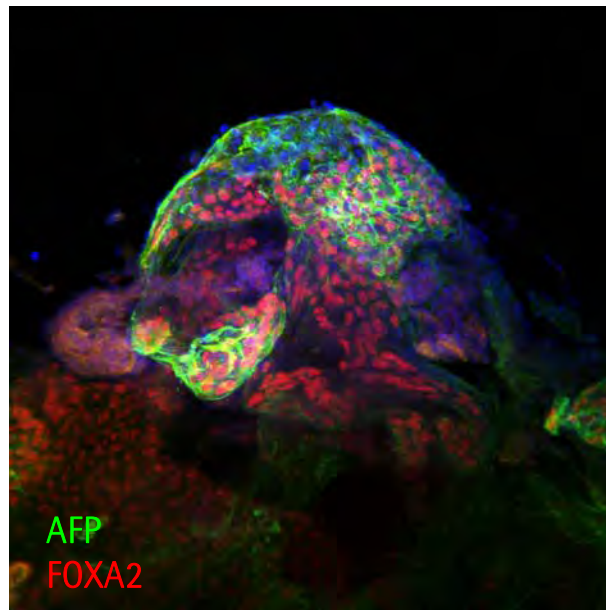


Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para Gata4 y AAS



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

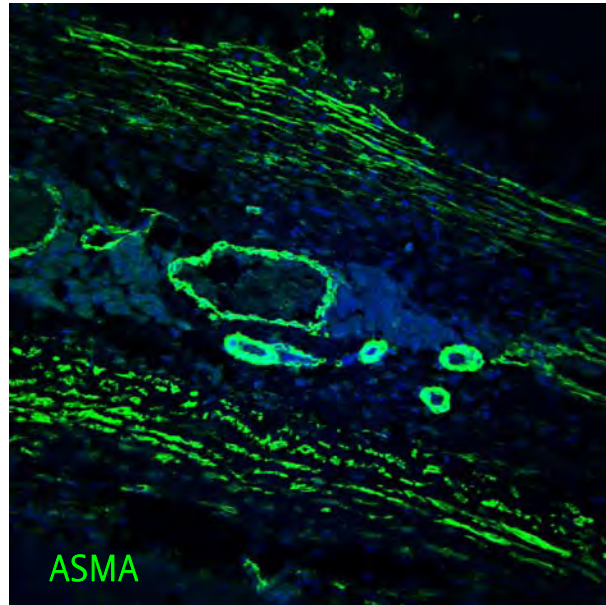




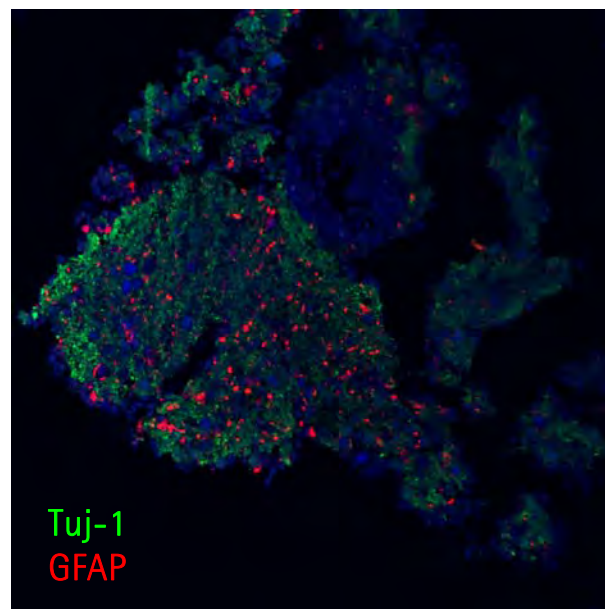
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para AFP y FOXA2

## Anexo 5

### Diferenciación *in vivo* [PD]FiPS022-V4F-15

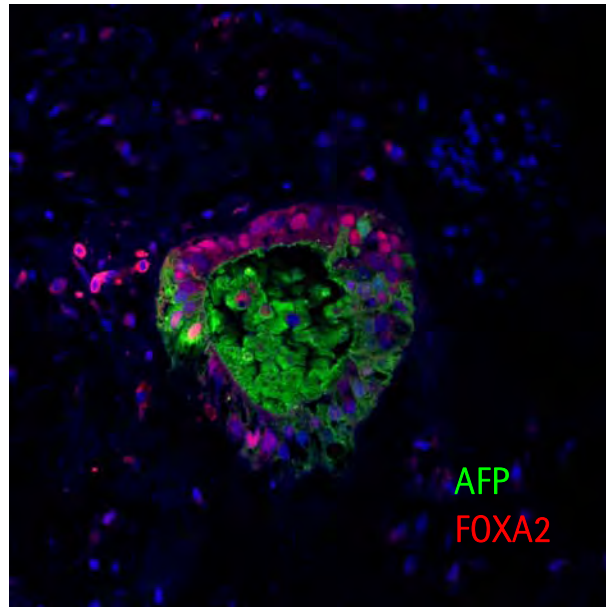


Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para ASMA.



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





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

## Anexo 6

### Genotipación de la línea [PD]FiPS022-V4F-15

## GENOTYPING PD-FiPS022

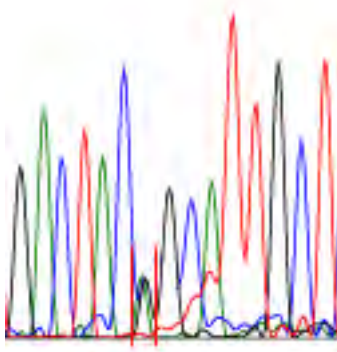
LINE	DIAGNOSE	GENE	MUTATION	MUTATION CONFIRMATION-CMRB
FiPS022 V4F#15	Parkinson Disease	LRRK2	G2019S heterozygote	G2019S heterozygote

### SEQUENCING RESULT:

Sequence of PCR product on exon 41 of LRRK2

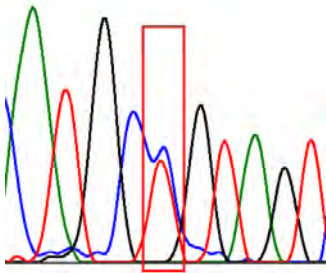
Forward primer

AGGTCTGAAACCCACAATGTGCTGCTTTTCCACTGTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGC  
 T **GACTAC(G/A)GCATTGCT** CAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAACATCAGAGGGCACACCAGAA  
 GGATCTCACGTGTTCTCTCTACCCCCTTGGTTTTCTTTGAATCCAATTGTCCTCTGATGGTTAATTTT  
 CTAATATTGT



Reverse primer

**ATGC(C/T)GTAGT** CAGCAATCTTTGCAATGATGGCAGCATTGGGATACAGTGTGAAAAGCAGCACAT  
 TGTGGGGTTTCAGGTCTCGGTATATAATCATGGCTGAGTGGAGGTA



Result:

Point mutation **is heterozygotically** observed on primary fibroblasts PD\_022 (yellow mark, red square).