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 — Información General
Section 1 — General Information

Nombre de la línea: FiPS-4F-7
Name of the line: FiPS-4F-7

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 patologia?
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 10)

Ver Anexo 4
See Annex 4

SECCIÓN 2 — Datos del Depositante
Section 2 — Applicant Details

Investigador Principal: *Principal Investigator:* Anna Veiga Lluch	**Dirección Postal:** *Postal address:* Dr Aiguader 88 08003 Barcelona
Centro de Trabajo: *Institution:* Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona	**Teléfono** *(phone)***:** 93 3160360 **Fax:** 93 3160362 **E-mail:** blc@cmrb.eu

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

Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica *Tissue of origin and anatomic location of the biological sample* Piel de prepucio humano *Human foreskin*	
Muestra biológica *Biological sample* **Fresco** ☒ *Fresh* **Crioconservado** ☐ *Cryopreserved*	
Fecha de la donación del muestra biológica *Date of donation of the biological sample* 09/02/2009	**Fecha del uso o descongelación** *(si congelado)* *Date used or thawed (if frozen)* 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	**si**	**no**
Xenobiotics	*Yes*	*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
(Mycoplasm: by PCR)

(Ver Anexo 5)
(See Annex 5)

Marcadores: ver Anexo 1
Markers: see Annex 1

	Método (ARN/proteínas) *Method (RNA/proteins)*	**nº pase** *Passage n.*	**resultado** *results*	**comentarios** *comments*
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 *marker*	**pase** *passage*	**resultado** *result*	**marcador** *marker*	**pase** *passage*	**resultado** *result*	**marcador** *marker*	**pase** *passage*	**resultado** *result*
In Vitro	**Tuj1**		+	**AFP**		+	**SMA**		**+**
In vitro			+	**FOXA2**		+			
(Anexo 2)									

In vivo/ *in vivo (Anexo 3)* **Método:** formación de teratomas en ratones SCID **Resultado:** +
pase/*passage:* *Method: teratoma formation in SCID mice* *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 2).

Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture in culture medium. Ectoderm: EBs culture in N2/B27on 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 (4.10^6)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: gPCR para integración de provirus
Integration of reprogramming transgenes: gPCR 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 22 pases
The line has been cultured during 22 passages

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

p22

¿Ha sido la línea modificada genéticamente? *Has the line been genetically modified?*	**¿Se llevó a cabo un análisis clonal?** *Has a clonal analysis been carried out?*
Sí *Yes* ☒ **No** *No* ☐	**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
Constructs and retroviral production

Se ha producido la línea de 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

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

CMR[B]

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

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR **FiPS-4F-7** EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.

CMR[B]

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

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia **FiPS-4F-7**

Anexo 2: Diferenciación *in vitro* **FiPS-4F-7**

Anexo 3: Diferenciación *in vivo* **FiPS-4F-7**

Anexo 4: Cariotipo **FiPS-4F-7**

Anexo 5: Resultado Test de mycoplasma (PCR) **FiPS-4F-7**

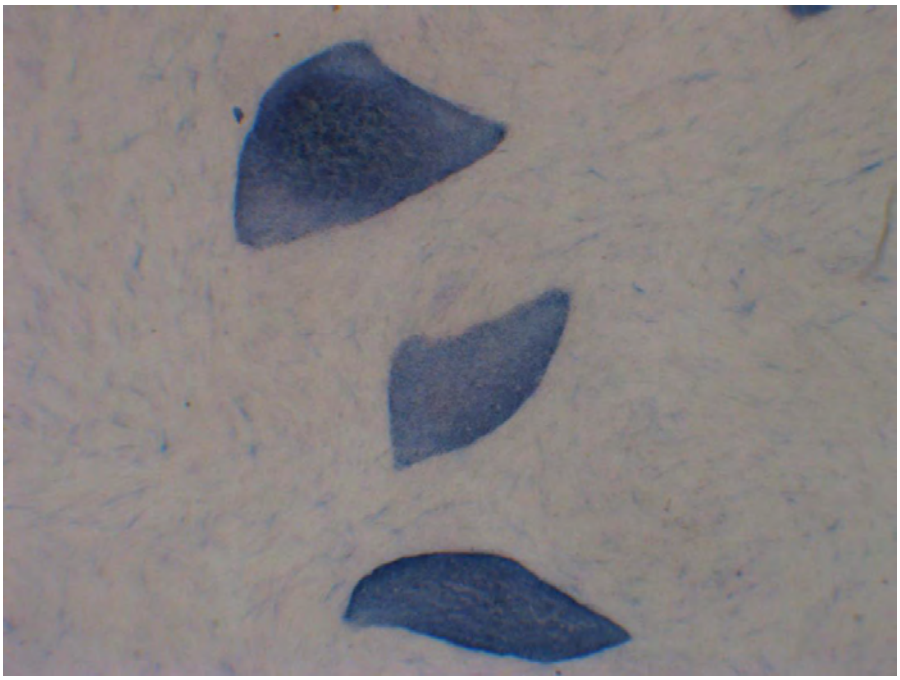
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación **FiPS-4F-7**

CMR[B]

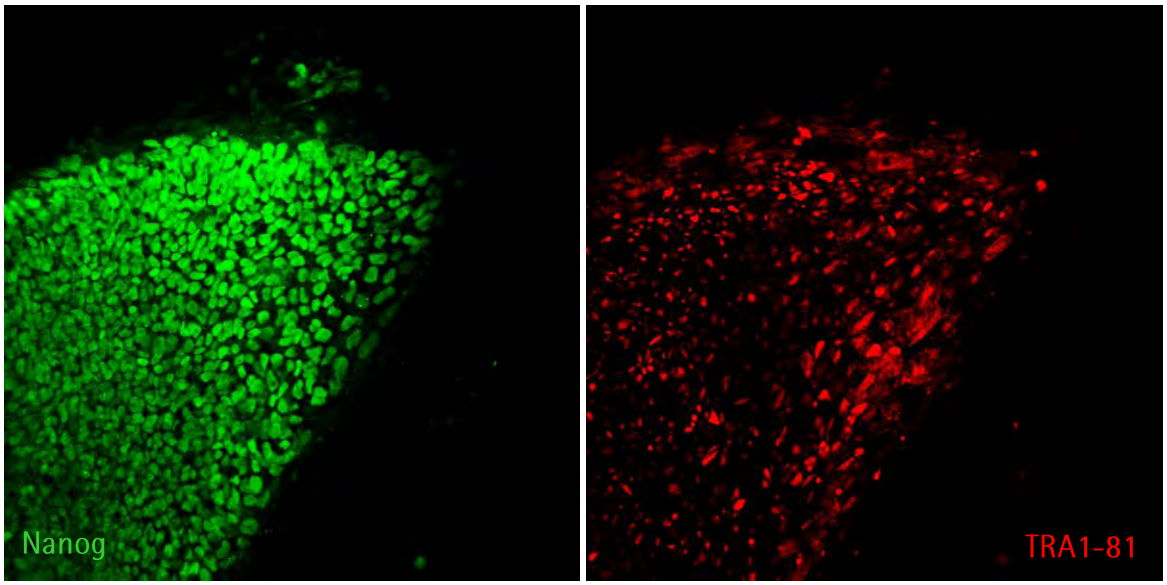
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 1

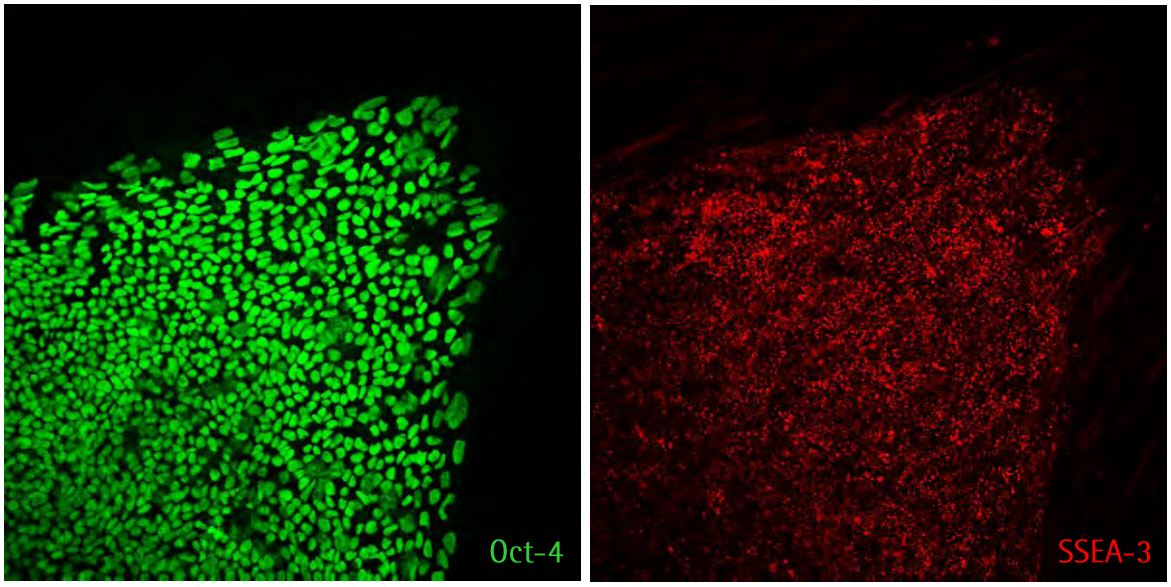
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia **FiPS-4F-7**



Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes **FiPS-4F-7**



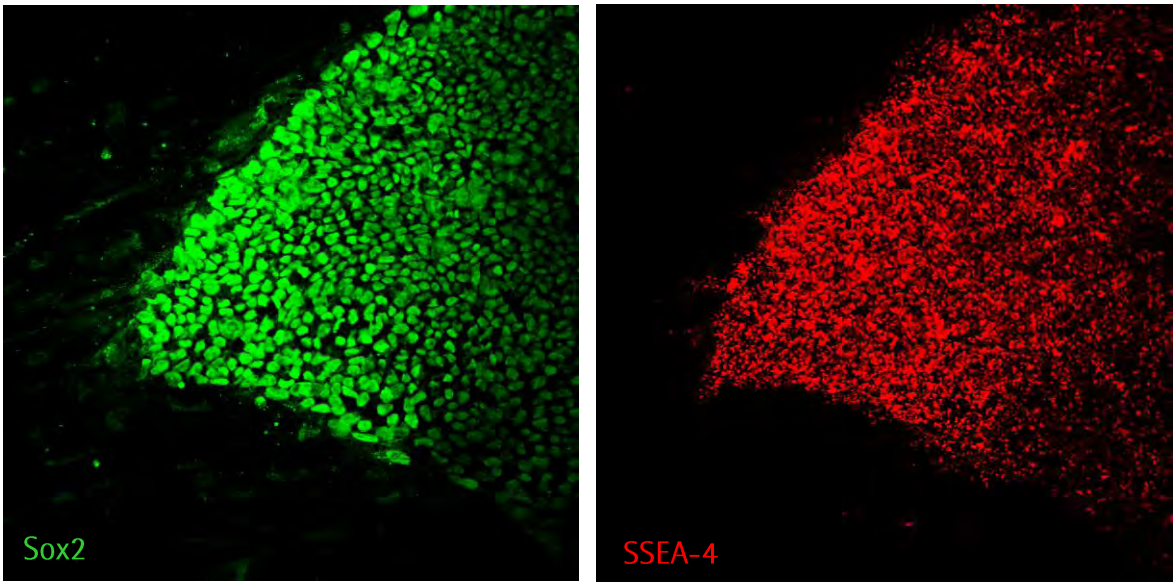
Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes **FiPS-4F-7** para **Nanog** y **TRA1-81**

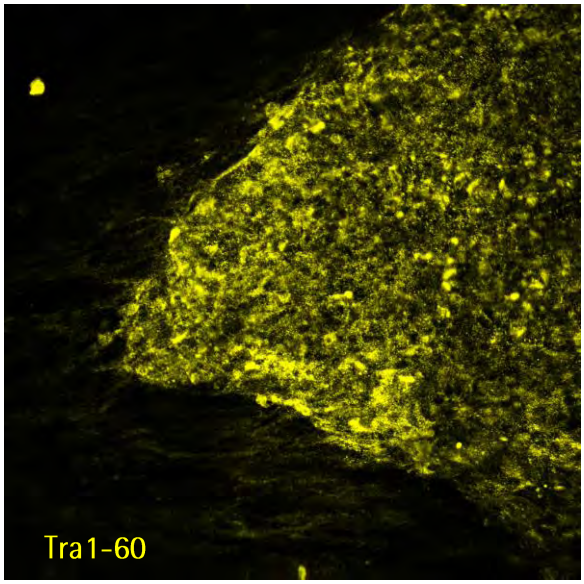


Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes **FiPS-4F-7** para **Oct-4** y **SSEA-3**

CMR[B]

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





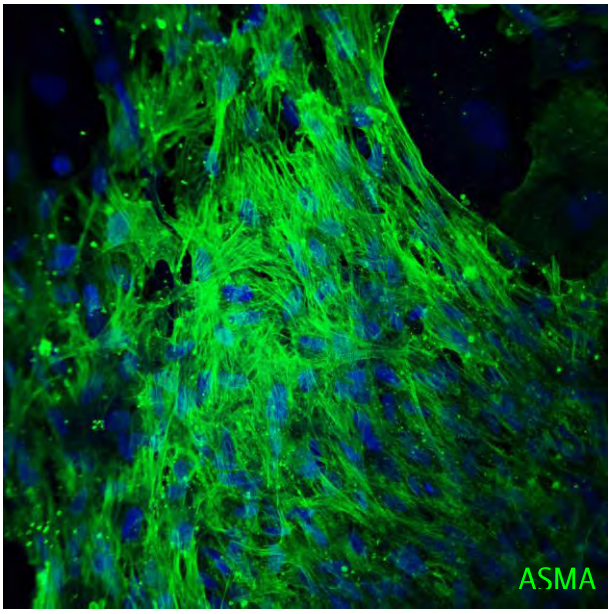
Inmuno-reactividad de la línea de células madre pluripotentes **FiPS-4F-7** para **Sox-2**, **SSEA-4** y **TRA1-60**

CMR[B]

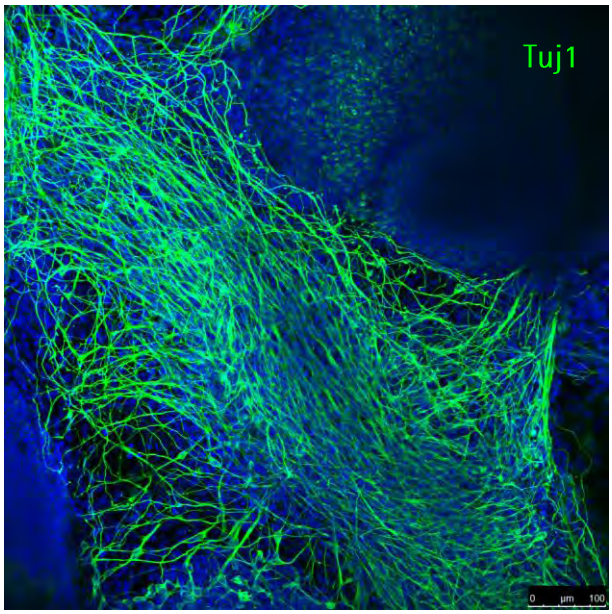
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 2

Diferenciación *in vitro* FiPS-4F-7



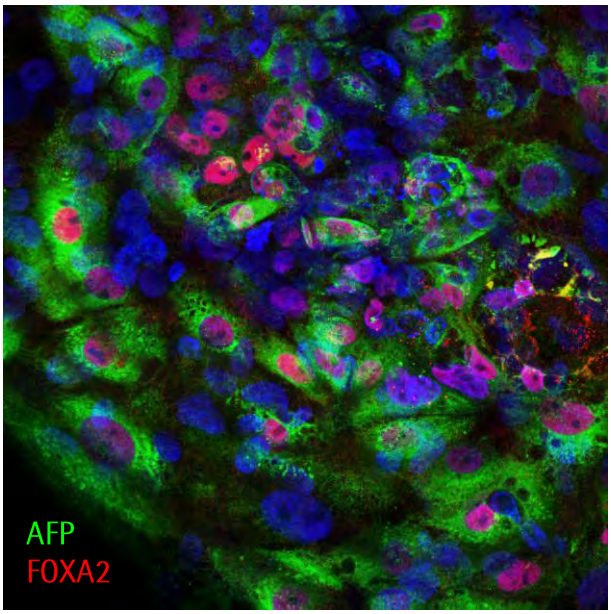
Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA**



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

CMR[B]

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



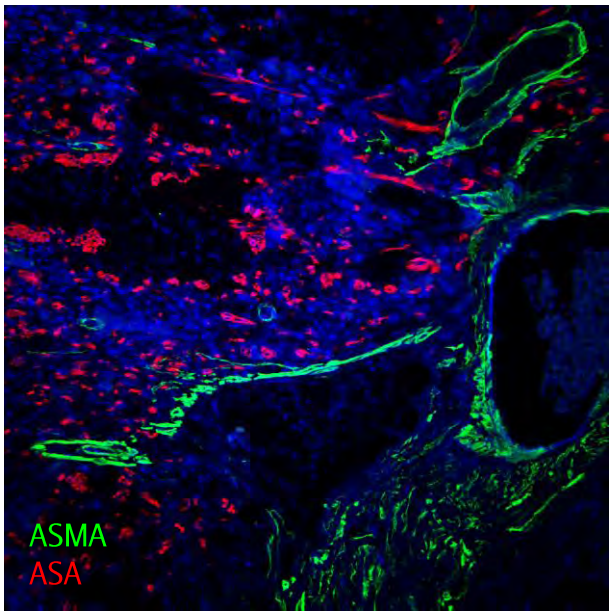
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

CMR[B]

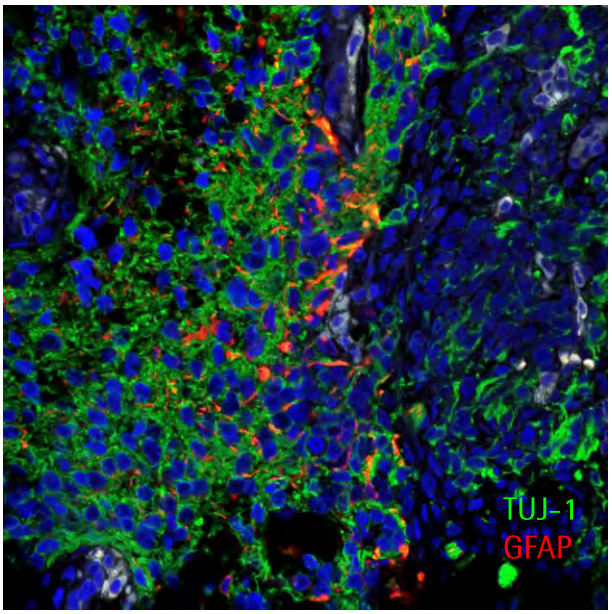
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 3

Diferenciación *in vivo* FiPS-4F-7



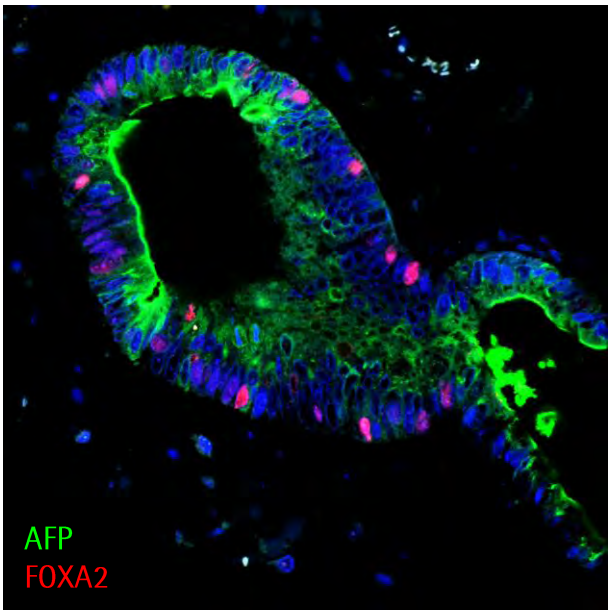
Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para **ASMA y ASA**



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

CMR[B]

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



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

CMR[B]

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

Anexo 4

Cariotipo FiPS-4F-7

CMR[B]
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Fips 4F#7

Fips 4F#7

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 **20** metafases procedents dels cultius cel.lulars de la mostra.

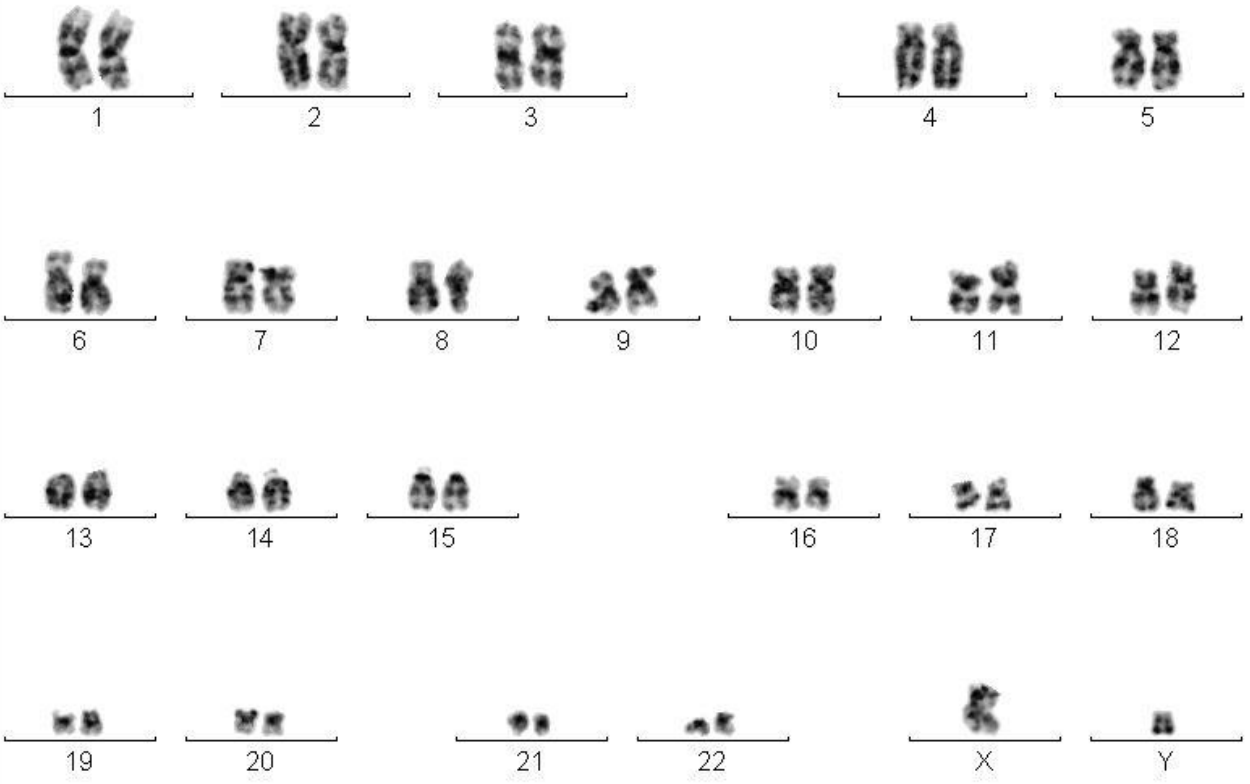
Observacions:
El resultat citogenètic no exclou la presència d'anomalies no detectables per les limitacions pròpies de la tècnica, com poden ser: contaminació materna, mosaics de baixa freqüència i alteracions estructurals mínimes (microdelecions i microduplicacions). Les troballes que s'interpreten 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

CMR[B]

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



14CM0364	009	A	46,XY	46

CMR[B]

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

Anexo 5

Resultado Test de mycoplasma (PCR)

CMR[B]

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

Mycoplasma

FiPS4F-7

CMR[B]

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

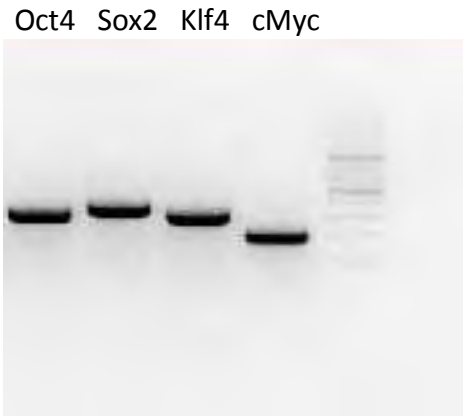
Anexo 6

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

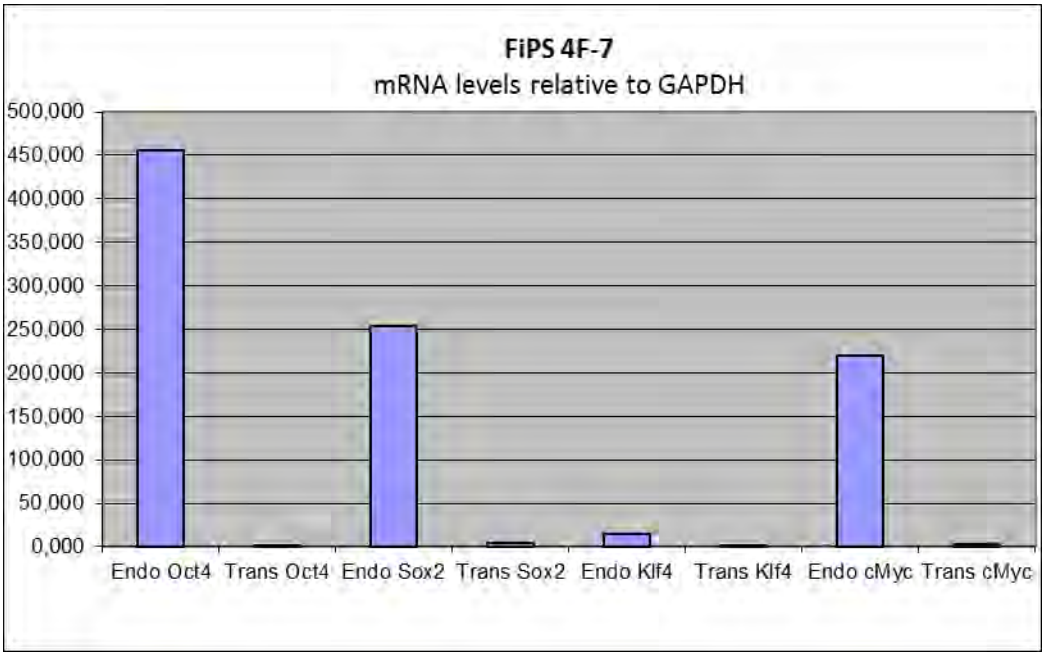
CMR[B]
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Integration FiPS4F-7

-



Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los 4 genes utilizados Oct-4, Sox-2, Klf4 y cMyc para generar la línea FiPS-4F-7



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