

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-3F-1

Name of the line: FiPS-3F-1

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga Lluch, Ignacio Rodriguez-Pizà

Principal Investigator: Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga Lluch, Ignacio Rodriguez-Pizà

Tipo de célula de la que se obtiene la línea:

Cell type origin of the cell line

Fibroblastos de prepucio humano.

Human foreskin fibroblasts

¿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 **SÍ** (especificar)
No Yes (specify)

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado
Genetic identity of the cell line. Method and result

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 Anna Veiga Lluch, Ignacio rodriguez-Pizà	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 de prepucio humano	
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> 9.02.2009	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 9.02.2009

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).

Soporte: fibroblastos de prepucio humanos procedentes de la misma muestra cultivados en condiciones libres de xenobióticos.

Support: human foreskin fibroblasts from the same sample cultured in xenofree conditions.

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).

Reprogramming of human fibroblasts to induce pluripotent stem cells under xeno-free conditions. Rodriguez-Pizà et al. Stem Cells 2009, 28: 36-44.

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio*

Método de pase: *Passage method*

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 negativa
(Bacteriology)

Micología negativa
(Mycology)

Micoplasma: PCR negativo
(Mycoplasma: by PCR)

Ver Anexo 1
See Annex 1

Marcadores: ver Anexo 2 (Annex 2)*Markers: see Annex 2*

	Método (ARN/proteínas) <i>Method (RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct4	inmunofluorescencia	18	+	
Nanog	inmunofluorescencia	18	+	
Rex 1	-			
Sox 2	inmunofluorescencia	18	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	18	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	18	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	18	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	18	+	
Telomerasa				
Fosfatasa Alk.	Actividad	27	+	
Otros				

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	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 Anexo 4	TUJ1	18	+	α -feto proteina FOXA2	18	+ +	ASA, SMA GATA4	18 18	+ +
<i>In vitro</i> Annex 4	<i>TUJ1</i>	<i>18</i>	<i>+</i>	<i>α-feto protein</i> <i>FOXA2</i>	<i>18</i>	<i>+ +</i>	<i>ASA, SMA</i> <i>GATA4</i>	<i>18</i> <i>18</i>	<i>+ +</i>
In vivo/ in vivo (ver Anexo 5) pase/passage 27	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***Reprogramming of gene expression profile*

Sí. Q-RT-PCR de 5 genes de pluripotencia (Oct4, Sox2, Klf4, Nanog y Cripto).

Yes. Q-RT-PCR of 5 pluripotency genes (Oct4, Sox2, Klf4, Nanog and Cripto).

Reprogramación del perfil de metilación del ADN*Reprogramming of DNA methylation profile*

Sí. Análisis de metilación del DNA del promotor Oct4. El resultado indicó activación estable del gen.

Yes. Bisulfite mutagenesis DNA analysis of Oct4 promoter methylation. The result indicated stable activation of the gen.

Longitud telomérica

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. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27. (ver Anexo 4)

Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (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*HLA typification data***HLA analysis and fingerprinting**

El HLA es el mismo que el de la línea ya registrada XF-iPSF44-3F-1 ya que proceden de la misma muestra.
The HLA is the same of the registered line XF-iPSF44-3F-1 as both lines come from the same sample.

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 3 genes; OCT4, SOX2 y KLF4.
qPCR showed the integration of the 3 genes; OCT4, SOX2 and KLF4

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

Se evidenció la silenciamiento de los 3 genes de reprogramación.
Silencing of reprogramming genes was shown

Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases*Long-term maintenance in culture:>20 passages***Si**

Yes

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

30

¿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):

Para la reprogramación, se sembraron aproximadamente 100.000 fibroblastos y se infectaron con una mezcla de sobrenadantes retrovirales para OCT4, SOX2 y KLF4. La infección consistió en una centrifugación a 750 x g tras la cual el sobrenadante permaneció en contacto con las células durante 24h. Se realizaron 2 rondas de hibridación en días consecutivos. Al día siguiente, se disociaron los fibroblastos y se sembraron sobre HFF-1 confluentes. Se cambió el medio diariamente. 25-35 días después de la infección inicial, se seleccionaron las colonias basándose en la morfología y se sembraron sobre nuevos HFF-1.

For reprogramming experiments, about 100.000 fibroblasts were seeded and infected with a mixture of retroviral supernatants encoding FLAG-tagged OCT4, SOX2 and KLF4. Infection consisted of 45 min spinfection at 750 x g after which supernatants were left in contact with the cells for 24h. Two rounds infection were performed on consecutive days. The following day fibroblasts were dissociated and seeded onto confluent HFF-1. The medium was then replaced daily. Colonies were picked based on morphology 25-35 days after the initial infection and plated onto fresh HFF-1.

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.

<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 Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Center of Regenerative Medicine of Barcelona</p> <p>Fecha / Date: 20/09/2010</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p> <p></p> <p>Fecha / Date 20/09/2010</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Miguel Gómez Clares</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: com@cmrb.eu</p>