

# 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:

- 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 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*

### SECCIÓN 1

#### Section 1

### Información General

#### General Information

**Nombre de la línea:**

iPSC-CoQ4<sup>mut</sup>-genetically corrected

**Investigador principal:**

*Principal Investigator:*

Pablo Menendez (Instituto Josep Carreras-Barcelona) y Plácido Navas (CABD-UPO-Sevilla)

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

*Cell type origin of the cell line*

Fibroblastos primarios de paciente de 4 años en síndrome de deficiencia de Coenzima Q10 debido a mutación heterocigótica en el gen COQ4.

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

*Has the donor any pathological condition?*

**NO**       **SÍ**  (especificar)

Síndrome de deficiencia de Coenzima Q10 debido a mutación heterocigótica en el gen COQ4

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

*Is the pathological condition of genetic origin?*

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

Si, su padre porta la misma mutación pero es asintomático.

## Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

*Genetic identity of the cell line. Method and result*

Se ha realizado fingerprinting y se ha constatado que la mutación del paciente está presente en las iPSC derivadas de este. Esto se ha realizado por PCR y por secuenciación. (VER ANEXO 1)

### Cariotipo/Karyotype

**Euploide/Euploid**  **Anormal/Atypical**  (especificar/specify)

Se ha realizado bandeo G en 20 metafases tras 20 pases en cultivo y las células son euploides. (VER ANEXO 2)

## SECCIÓN 2

### Section 2

## Datos del Depositante

### Applicant Details

|  |  |
|--|--|
| <b>Investigador Principal:</b><br><i>Principal Investigator:</i><br><br>Pablo Menendez<br>Plácido Navas                                    | <b>Dirección Postal:</b><br><i>Postal address:</i><br><br>Pablo Menéndez PhD<br>ICREA Research Professor<br>Josep Carreras Leukaemia Research Institute<br>Carrer Casanova 143. 08036. Barcelona. Spain                |
| <b>Centro de Trabajo:</b><br><i>Institution:</i><br><br>Josep Carreras Leukaemia Research Institute<br>Universidad Pablo de Olavide (CABD) | <b>Teléfono (phone):</b> 935572809<br><b>Fax:</b> 933231751<br><b>E-mail:</b> <a href="mailto:pmenendez@carrerasresearch.org">pmenendez@carrerasresearch.org</a> ;<br><a href="mailto:pnavas@upo.es">pnavas@upo.es</a> |

## 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><br><i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i><br><br>La muestra procede de fibroblastos humanos primarios de biopsia de piel de obtenida de un niño de 4 años con deficiencia de CoQ10. |   |
| <b>Muestra biológica</b><br><i>Biological sample</i><br><br><b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/><br><i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>  |   |
| <b>Fecha de la donación del muestra biológica</b><br><i>Date of donation of the biological sample</i><br><br>2012  | <b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i><br><i>Date used or thawed (if frozen)</i><br><br>No se congeló. Se expandió y una vez conseguidos stocks se fueron almacenando viales en nitrógeno líquido. |

**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).*

Las iPSC se han generado en MEFs de la cepa CF1, irradiados. Se han mantenido en MEFs hasta su estabilización y caracterización. Luego se han pasado y adaptado a matrigel (soporte sin feeders). Siempre se han crecido con medio de ESC convencional (medio condicionado por MEFs; Menendez et al Mol Ther 2004) que contiene KO-DMEM+KO-SR+L-Glu+8ng de bFGF.

Las iPSC se han generado con virus de sendai polisistronicos (SeV-OKSM).

**Mantenimiento de la línea: Line maintenance**

En MEFs y en matrigel. Se mantiene con medio condicionado por MEFs.

**Ratio de pase: Passage ratio**

Se ha estado pasando 1:2, 1:3, 1:4 y 1:10 sin cambios en su estatus pluripotente.

**Método de pase: Passage method**

Se usa tripsina 0.05% durante 30 seg y se pasan en "clumps". Si hay muchas células diferenciadas se pasan con colagenasa/dispasa.

**Xenobióticos** **si**  
*Xenobiotics* *Yes*

**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)*

Las colonias son típicas de iPSC o hESC. Tienen una alta relación núcleo:citoplasma. Hay colonias de tamaños diferentes pero todas tienen fenotipo epitelial excepto las de los bordes donde hay alguna célula haciendo EMT hacia diferenciación. (VER ANEXO 3)

**Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)**

*Microbiological controls carried out (indicate in detail)*

**Bacteriología**

*(Bacteriology)*

No se ha testado.

**Micoplasma: PCR**

*(Mycoplasma: by PCR)*

Las células se han testado cada 4-5 semanas para micoplasma y son negativas por PCR. (VER ANEXO 4)

**Marcadores: (VER ANEXO 5)**

*Markers*

|                                  | Método<br>(ARN/proteínas) | nº pase | resultado | comentarios |
|----------------------------------|---------------------------|---------|-----------|-------------|
| <b>Oct 4</b>                     | ARN                       | p20     | +         |             |
| <b>Nanog</b>                     | ARN                       | p20     | +         |             |
| <b>Rex 1 (opcional/optional)</b> | ARN                       | p20     | +         |             |
| <b>Sox 2</b>                     | ARN                       | p20     | +         |             |
| <b>SSEA3</b>                     | proteína                  | p20     | +         |             |
| <b>SSEA4</b>                     | proteína                  | p20     | +         |             |
| <b>TRA-1-60</b>                  | proteína                  | p20     | +         |             |
| <b>TRA-1-81</b>                  | proteína                  | p20     | +         |             |
| <b>Fosfatasa Alc.</b>            | proteína                  | p20     | +         |             |

**Capacidad de diferenciación (VER ANEXO 6 (in vitro) y ANEXO 7 (in vivo))***Differentiation capacity*

|                         | <b>Ectodermo/ Ectoderm</b>       |                               |                                   | <b>Endodermo/Endoderm</b>        |                               |  | <b>Mesodermo/ Mesoderm</b>       |                               |                                   |
|-------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
|                         | <b>marcador</b><br><i>marker</i> | <b>pase</b><br><i>passage</i> | <b>resultado</b><br><i>result</i> | <b>marcador</b><br><i>marker</i> | <b>pase</b><br><i>passage</i> | <b>resultado</b><br><i>result</i>                            | <b>marcador</b><br><i>marker</i> | <b>pase</b><br><i>passage</i> | <b>resultado</b><br><i>result</i> |
| <b>In Vitro</b>         | Tuj1<br>Isl1<br>Nestin           | p30<br>p30<br>p30             | +<br>+<br>+                       | AP                               | p20                           | +  | no testado                       |                               |                                   |
| <b>In vivo/ in vivo</b> | <b>Método:</b><br><i>Method:</i> |                               | <b>teratomas s.c</b>              |                                  |                               | <b>Resultado: positivo (3 germ layers)</b><br><i>Result:</i> |                                  |                               |                                   |

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

Los promotores de NANOG y OCT4 se demetilan en las iPSC (VER ANEXO 8)

**Descripción de las características de diferenciación *in vitro****Description of the differentiation characteristics in vitro*

Las células se han diferenciado con éxito a fibroblastos, músculo esquelético (protocolo de Perlingeiro lab) y neuronas motoras (Amoroso et al) y precursores neuronales. Estos linajes expresan marcadores como Nestin, Tuj1, Isl1, AP, Pax7 etc. (VER ANEXO 6)

**Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas***Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

1 T25 al 70% de confluencia se ha inyectado vía subcutánea en ratones NSG. Tras 6 semanas han aparecido teratomas que han sido fijados y analizados por hematoxilina eosina mostrando tejidos de las 3 capas germinales. No, pero mostramos que los virus de Sendai se apagan (VER ANEXO 7)

**Datos de la tipificación HLA***HLA typification data*

Se ha hecho fingerprinting pero no tipaje HLA. (VER ANEXO 1)

**Integración de los transgenes de reprogramación: gPCR para integración de provirus***Integration of reprogramming transgenes: gPCRfor provirus integration*

Los genes no se integran porque los SeV son no integrativos.

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

Mostramos por qPCR que los virus de Sendai se apagan (VER ANEXO 9)

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

Las iPSC se han mantenido por más de 30 pases y mantienen su pluripotencia y cariotipo normal. Son micoplasma negativas y sobreviven perfectamente a la congelación y descongelación.

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

Hay iPSc congeladas en distintos tiempos: tras 5, 10, 15, 20 pases etc.

|   |   |
|---|---|
| <p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b><br/><i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p><b>Sí</b> Yes <input checked="" type="checkbox"/>                      <b>No</b> No <input type="checkbox"/></p> <p><b>Comentarios/ Comments:</b><br/>Se ha corregido la mutación mediante el sistema CRISPR/Cas9</p> | <p><b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b><br/><i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p><b>Sí/</b> Yes <input type="checkbox"/> <b>No</b> <input checked="" type="checkbox"/>      <b>Resultado / Result</b></p> |
|---|---|

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

**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.*

|  |   |
|--|---|
| <b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b><br><i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i><br><br><br>Fecha/ Date: 13 November, 2015 | <b>Firma del Investigador Principal</b><br><i>Signature of the Principal Investigator</i><br><br><br>Fecha /Date: 13 November, 2015 |
| <b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b><br><i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i>   |   |
| <b>Dirección Postal:</b><br><i>Postal Address:</i><br><br>Carles Esquerre I Victori<br>Gerente<br>Institut Josep Carreras contra la leucèmia<br>Muntaner 383, 3rd 2n<br>08021 Barcelona  | <b>Teléfono /Telephone:</b> 935543050<br><b>Fax:</b> 934651472<br><b>E-mail:</b> cesquerre@ <a href="mailto:cesquerre@carrerasresearch.org">carrerasresearch.org</a>  |