

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

Application Form to Deposit a Human Cell Line

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: [GA]FiPS4F

Name of the line: [GA]FiPS4F

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga Lluch, Alessandra Giorgetti

Principal Investigator:

Origen de la línea celular:

Origin of the cell line

Embrionario **Fetal** **Adulto**
Embryonic *Fetal* *Adult*

¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?

Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?

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

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

| | |
|--|---|
| Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Juan Carlos Izpisúa Belmonte Anna Veiga Lluch Alessandra Giorgetti | 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 3160300 Fax: 93 3160362 E-mail: blc@cmrb.eu |

| | |
|---|---|
| <p>Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Fibroblastos procedentes de un paciente afecto de deficiencia de Glutaril aciduria dehidrogenasa. <i>Fibroblasts from a patient with Glutaril aciduria dehydrogenase deficiency disease</i></p> | |
| <p>Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fibroblastos procedentes de un paciente afecto de deficiencia de Glutaril aciduria dehidrogenasa. <i>Fibroblasts from a patient with Glutaril aciduria dehydrogenase deficiency disease</i></p> <p style="text-align: center;"> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i> </p> | |
| <p>Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 10.10.2003</p> | <p>Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 07.01.2009</p> |
| <p>Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 10.10.2003</p> | |

Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto)
General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)

Descongelar 1 vial de fibroblastos (pase 1-5) y sembrar en 6 pocillos de una placa de 6 pocillos con medio DMEM+10% FBS. Incubar a 37°C, 5% CO₂. Cuando estén aproximadamente 50-60% confluentes tripsinizar y sembrar 1x10⁵ en una placa de 6 pocillos en medio DMEM+10% FBS. Platear 6 pocillos: 5 para la reprogramación con OSKM o OSK y 1 como control positivo con GFP. Incubar durante 24h.
Tras 24h las células deben estar confluentes 40-50%. Aspirar el medio de las placas de fibroblastos y añadir 4ml de la mezcla de sobrenadante retroviral de OSKM o OSK filtrado. Centrifugar la(s) placa(s) a 750g durante 45 min. a 32°C. Dejar el medio de retrovirus en los pocillos y incubar a 37°C, 5%CO₂ durante 24h. Tras 24h. repetir la infección. Al día siguiente aspirar el medio y añadir 2ml de DMEM+10% FBS y incubar 24h.
Un día después de la 2ª infección tripsinizar las células y platear en placas de 100 mm presembradas con HFF-1 irradiados y en presencia de medio hES. Incubar a 37°C, 5% CO₂. Tras dos días cambiar el medio hES diariamente hasta que aparezcan colonias.

Thaw 1 vial of fibroblast at passage 0-5 and seed into pre-coated 6-wells of 6-well plate with DMEM medium+ 10%FB Incubate at 37 °C, 5% CO₂. When the cells are approximately 50-60% confluent trypsinize them and seed 1x10⁵ of fibroblast in a 6-well plate in presence of DMEM+10% FBS. Plate 6 wells: 5 for reprogramming with OSKM or OSK and 1 as a positive control with GFP reporter. Place in a 37 °C 5% CO₂ incubator for 24h.

The following day the cells should be 40-50% confluent. Aspirate the medium of the fibroblast plates and add fresh 4 ml OSKM or OSK mix of retroviral supernatant filtered. Centrifuge the plate(s) at 750xg for 45 min at 32 °C. Leave the retrovirus containing media in the wells and incubate at 37 °C, 5% CO₂ for 24h. After 24 h repeat, the infection as above. The day after aspirate the medium and add 2 ml of DMEM medium+10% FBS and incubate at 37 °C, 5% CO₂ for 24h.
One day after the second infection trypsinize the cells and plate them onto 100-mm plates preseeded with irradiated HFFs and in presence of hES medium. Incubate the plate at 37 °C, 5% CO₂. After 2 days change the hES medium daily until iPSC colonies appear.

En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado

If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method

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: Matrigel (Becton Dickinson, S.A. cat. No. 356234),
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), 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 X
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)

Análisis de micoplasma.

Mycoplasma analysis.

Marcadores: Ver Anexo 1*Markers*

| | Método (ARN/proteínas) | nº pase | resultado | comentarios |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| | <i>Method (RNA/proteins)</i> | <i>Passage n.</i> | <i>results</i> | <i>comments</i> |
| Oct4 | inmunofluorescencia | 12 | + | |
| Nanog | inmunofluorescencia | 12 | + | |
| Rex 1 | - | | | |
| Sox 2 | inmunofluorescencia | 12 | + | |
| SSEA3 | inmunofluorescencia | 12 | + | |
| SSEA4 | inmunofluorescencia | 12 | + | |
| TRA-1-60 | inmunofluorescencia | 12 | + | |
| TRA-1-81 | inmunofluorescencia | 12 | + | |
| Telomerasa | | | | |
| Fosfatasa Alk. | Actividad | 15 | + | |
| Cariotipo | | 11 | 46, XX | ver Anexo 2 |
| Otros | | | | |

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 | GFAP | 13 | + | α -feto proteina | 13 | + | actina sarcomerica | 13 | + |
| Anexo 3 | Tuj1 | 13 | + | FoxA2 | | | PAX7 | 13 | + |
| <i>In vitro</i> | <i>GFAP</i> | <i>13</i> | <i>+</i> | <i>α-feto protein</i> | <i>13</i> | <i>+</i> | <i>sarcomeric actin</i> | <i>13</i> | <i>+</i> |
| <i>Annex 3</i> | <i>Tuj1</i> | <i>13</i> | <i>+</i> | <i>FoxA2</i> | | | <i>PAX7</i> | <i>13</i> | <i>+</i> |

In vivo/ in vivo p 15 (Anexo 4) **Método:** formación de teratomas en ratones SCID **Resultado: +**
Method: teratoma formation in SCID mice *Result: +*

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.

Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27.

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 4).

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 4).

Datos de la tipificación HLA

HLA typification data

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.

Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.

Se observa consistencia celular tras congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

Cellular consistency after freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.

Pase en el momento del registro

Passage at the time of the recording

p16

¿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):

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 <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i> <p style="text-align: right;">Fecha/ Date: 21/05/2010</p> | Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  <p style="text-align: right;">Fecha /Date: 21/05/2010</p> |
| Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Miguel Gómez Clares. Presidente de la Junta de Gobierno | |
| Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88, 7ª planta 08003. Barcelona. | Teléfono /Telephone: +34 93 316 03 00 Fax: +34 93 316 03 00 E-mail: com@cmrb.eu |