

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: [K]iPS4F-8

Name of the line: [K]iPS4F-8

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Trond Aasen, 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, Trond Aasen, 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 3160301 E-mail: blc@cmrb.eu

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Queratinocitos de prepucio <i>Foreskin keratinocytes</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> <p style="text-align: center;">Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i></p>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 26.04.2008	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 27.04.2008
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 26.04.2008	

<p>Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i></p> <p>Se recoge la biopsia en medio para keratinocitos libre de suero y bajo en calcio (Epilife, Invitrogen) que contiene tres tipos de antibióticos (100U/mL pen-strept. y 10 <input type="checkbox"/>g/mL amf.). Se coloca la biopsia en una placa (10 mm), se corta en varios trozos y se incuba 12-18h a 4°C en dispa diluida en medio de keratinocitos para separar la dermis de la epidermis. Se separa la epidermis de la dermis con la ayuda de unas pinzas. Se incuba 1° min a 37°C en tripsina al 25%. Se añade medio de keratinocitos fresco y se lava a 1200 rpm 5 min. Se resuspende el pellet y se cultiva en medio Epilife en placas cubiertas con colágeno tipo I.</p> <p>The biopsy is collected in keratynocyte serum-free low calcium medium (Epilife, Invitrogene) containing three types of antibiotics (100U/mL penicillin-streptomycin and 10 mg/mL amphotericin). The biopsy is then placed in a 10 mm dish, cut in several small pieces, and incubated for 12-18 hours at 4°C in dispa diluted in keratinocyte medium to separate the dermis from epidermis. The epidermis is separated from dermis using a pair of forceps, is incubated for 10 minutes at 37°C in trypsin (0.25%) in a 15 mL tube. Fresh keratynocyte medium is added and centrifugate for 5 min at 1200 RPM. The pellet of cells is resuspended and cultured in Epilife medium on dish coated with type I collagen.</p>

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: 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/mecanichal*

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)

Mycoplasma (negativo)
Mycoplasma (negative)

Marcadores: <i>Markers</i>				
	Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct4	inmunofluorescencia	13	+	ver Anexo 1
Nanog	inmunofluorescencia	13	+	
Rex 1	-			
Sox 2	inmunofluorescencia	13	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	13	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	13	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	13	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	13	+	
Telomerasa				
Fosfatasa Alk.	Actividad	13	+	ver Anexo 1
Cariotipo		13	46, XY	ver Anexo 2
Otros				

Capacidad de diferenciación (ver Anexo 3) <i>Differentiation capacity</i>									
	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	GFAP	12	+	FoxA2	12	+	α-actina sarcomerica	12	+
	Tuj1	12	+	α-feto proteina	12	+	Gata 4	12	+
<i>In vitro</i>	GFAP	12	+	FoxA2	12	+	α- sarcomeric actin	12	+
	Tuj1	12	+	α-feto protein	12	+	Gata 4	12	+
In vivo/ in vivo (ver Anexo 4)			Método: formación de teratomas en ratones SCID <i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>				Resultado: + <i>Result: +</i>		

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, co-cultivándolos con células PA6.

Mesoderm: Embryoids bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture in culture medium. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 and co-culturing them with PA6 cells .

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

Se realizaron tinciones histológicas estándar con hematoxilina/eosina y a continuación fueron identificados tejidos procedentes de las tres capas germinales por un histopatólogo. También se realizaron pruebas de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de los mismos marcadores que en la diferenciación *in vitro*.

Standard histological staining was done with hemotoxilin/eosin and tissues derived from all three germ layer were identified by a hystopathologist. Immunohystochemistry staining also was performed to show the presence of the same markers than in vitro differentiation.

Datos de la tipificación HLA*HLA typification data***Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.***Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing. Results.*

Se observa consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación con crecimiento adecuado y características de indiferenciación.

Cellular consistency after 6 procedures of freezing and thawing, with adequate growth and undifferentiation characteristics.

Pase en el momento del registro 27*Passage at the time of the recording 27***¿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):

Se ha producido esta línea de iPS usando una infección retroviral para introducir en las células los siguientes factores de transcripción: Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc.

We have produced this iPS cell line using a retroviral infection to deliver in to the cells the selected four transcription factors: Oct-4, Sox2, Klf-4 and c-Myc

El DNA genómico de 10.000-25.000 células fue mutagenizado mediante la exposición durante 5h a una mezcla de bisulfito de sodio al 40.5% e hidroquinona 10mM (Epitect bisulfite kit). Las secuencias de interés de los promotores de Oct4 y Nanog fueron amplificadas mediante dos PCRs consecutivas. Los productos amplificados resultantes fueron clonados en los plásmidos PCR 2.1 o pGEM Easy, amplificados en células TOP10, purificados y secuenciados. La línea celular presenta una metilación casi completa de ambos promotores.

Genomic DNA of 10,000–25,000 cells was mutagenized by exposure for 5 h to a mixture of 40.5% sodium bisulfite and 10 mM hydroquinone (Epitect bisulfite kit). The promoter sequences of interest for Oct4 and Nanog were amplified by two subsequent PCRs. The resulting amplified products were cloned into PCR 2.1 or pGEM Easy plasmids, amplified in TOP10 cells, purified and sequenced. The cell line presented near complete demethylation of both promoters.

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]</p> <p><small>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Center of Regenerative Medicine in Barcelona</small></p> <p>Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA NIF: Q10000000</p> <p>Fecha / Date: 16/04/2009</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p> <p><i>Trond Larsen</i> <i>Miguel Gómez Clares</i></p> <p>Fecha /Date 16/04/2009</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Miguel Gómez Clares. Presidente de la Junta de Gobierno</p>	
<p>Dirección Postal: Postal Address: Dr. Aiguader, 88. 08003. Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: +34 93 316 03 00 Fax: +34 93 316 03 01 E-mail: com@cmrb.eu</p>

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [K]iPS4F-8 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.

ANEXOS

Anexo 1: Marcadores de indiferenciación [K]iPS4F-8

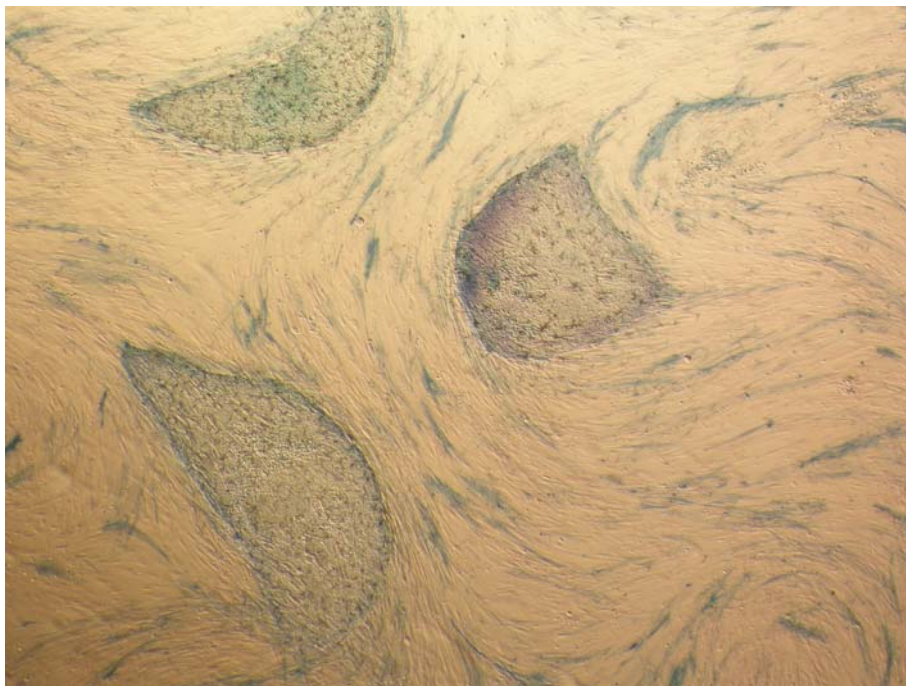
Anexo 2: Cariotipo [K]iPS4F-8

Anexo 3: Diferenciación *in vitro* [K]iPS4F-8

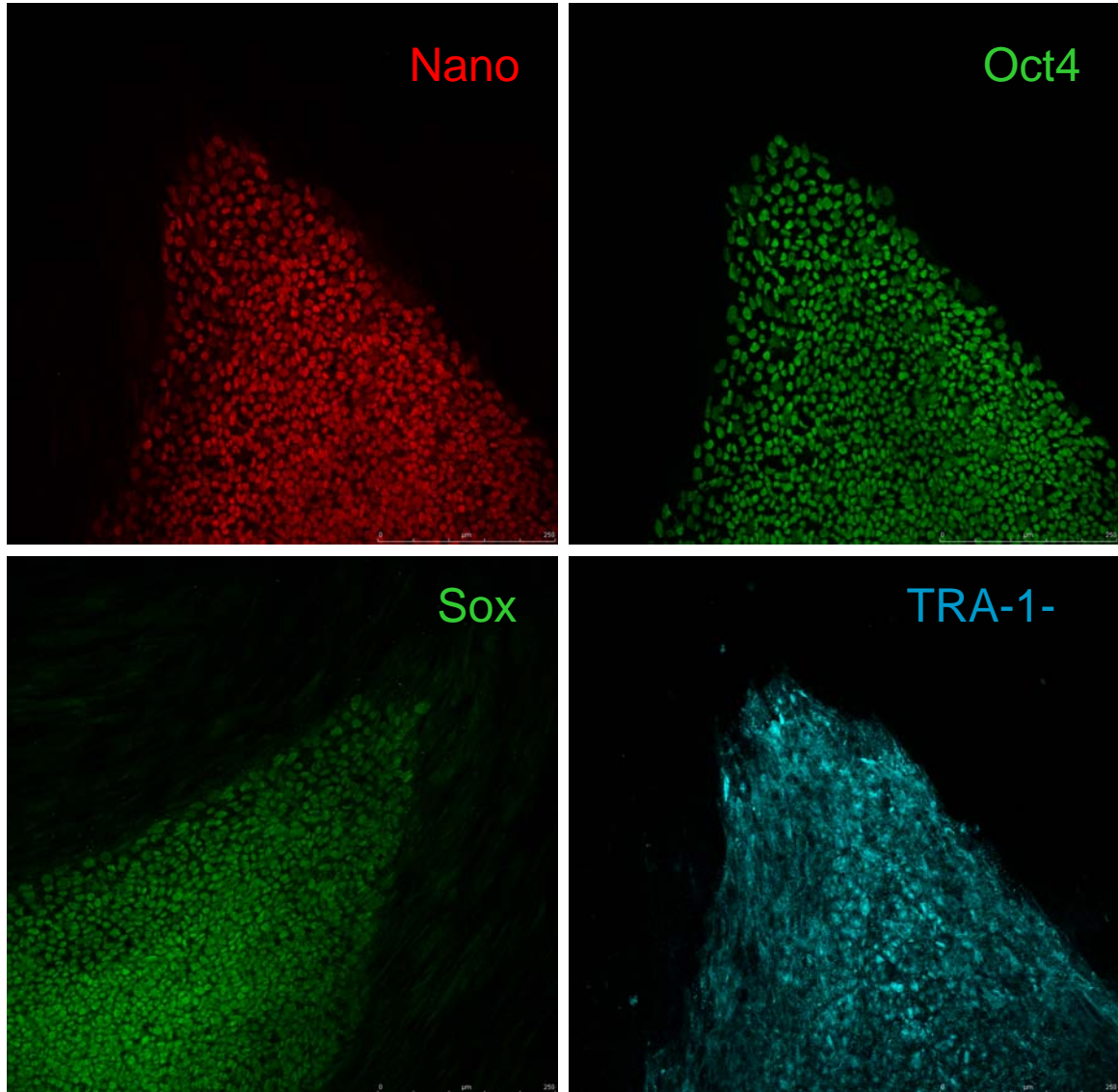
Anexo 4: Diferenciación *in vivo* [K]iPS4F-8

Anexo 1

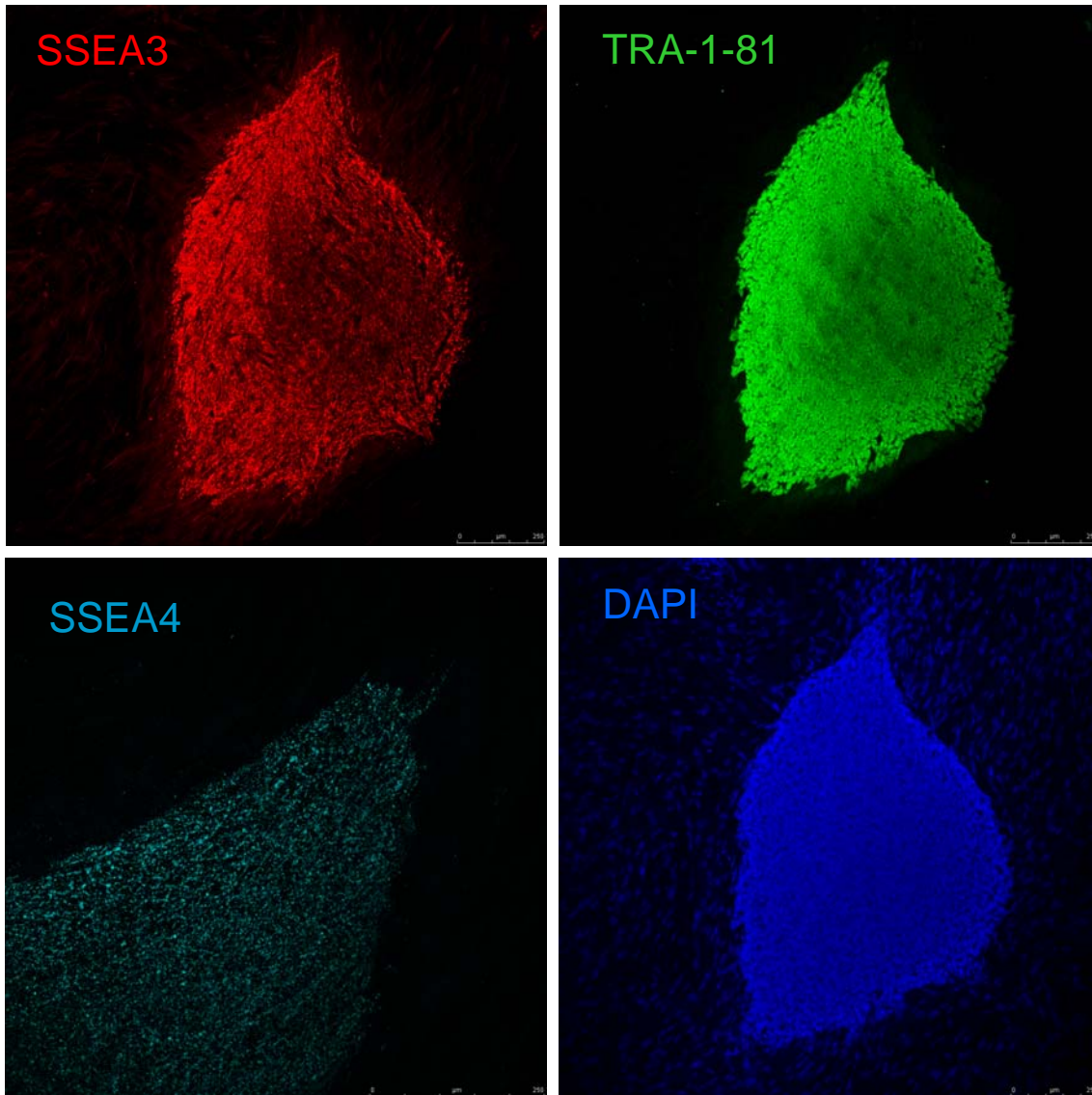
Marcadores de indiferenciación [K]iPS4F-8



Actividad fosfatasa alcalina de la línea de células madre pluripotentes [K]iPS4F-8.



Inmunodetección de la línea de células madre pluripotentes [K]iPS4F-8 para Oct-4, Nanog, Sox2 y TRA-1-60.



Immunodetección de la línea de células madre pluripotentes [K]iPS4F-8 para SSEA3, SSEA4, TRA-1-81 y DAPI.

Anexo 2 Cariotipo [K]iPS4F-8

**KiPS4F-8**

Data d'entrada: 10/11/2008

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 400bjh 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 degut a limitacions pròpies de la tècnica, com poden ser: mosaics de baixa freqüència i alteracions estructurals de mida petita (microdeleccions i microduplicacions).

Els estudis citogenètics tenen una fiabilitat superior al 99%.

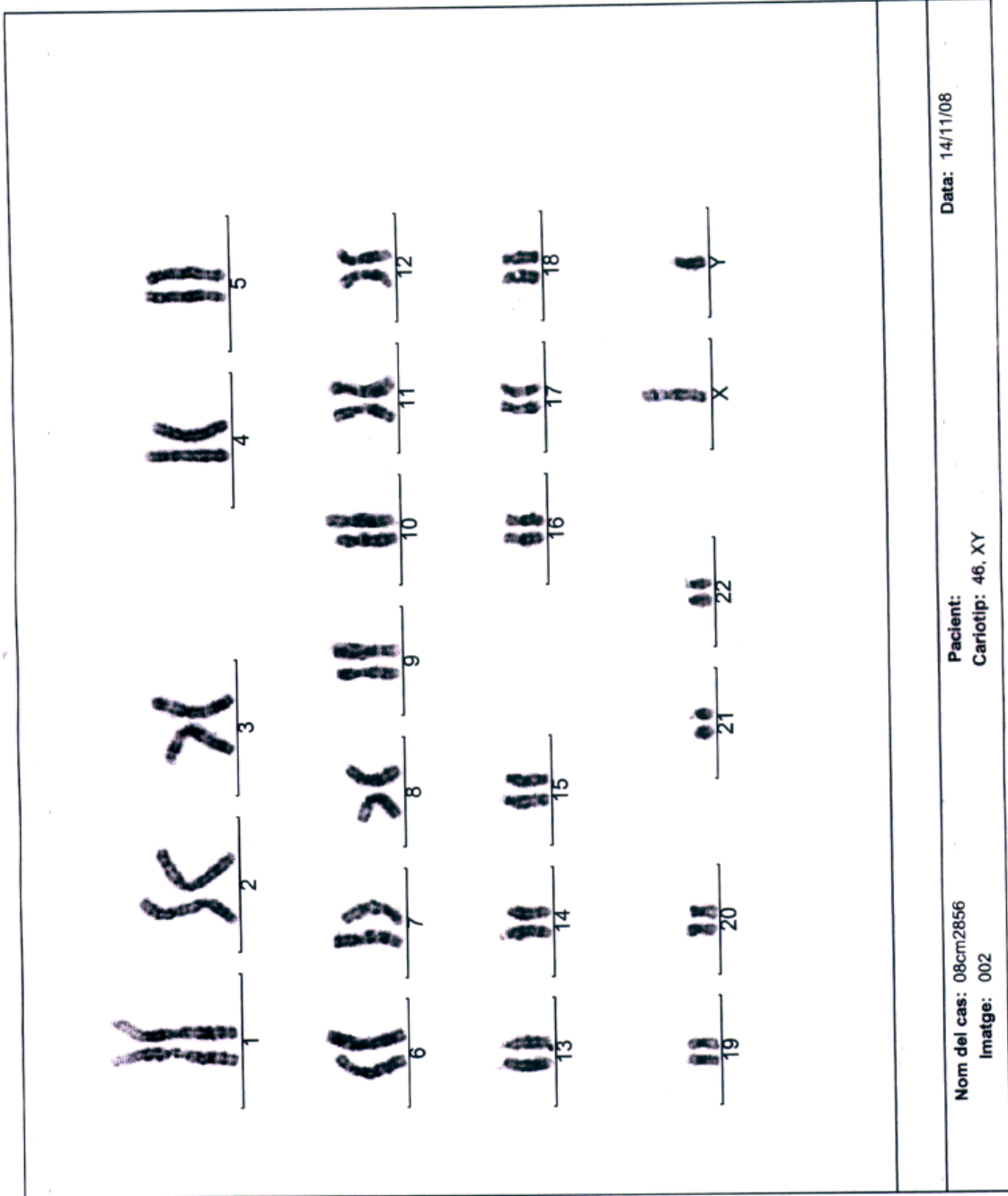
Barcelona, 20/11/2008



Dr. A. Serés Santamaría
Genetista clínic

CASANOVA, 153 ENTLO. A
08036 BARCELONA
TELEFONO 93 419 56 56
FAX 93 419 61 61
e-mail: laboratori@prenatalgenetics.net
www.prenatalgenetics.net

Laboratorio sometido al control de calidad británico para laboratorios de genética (UK-NEQAS).



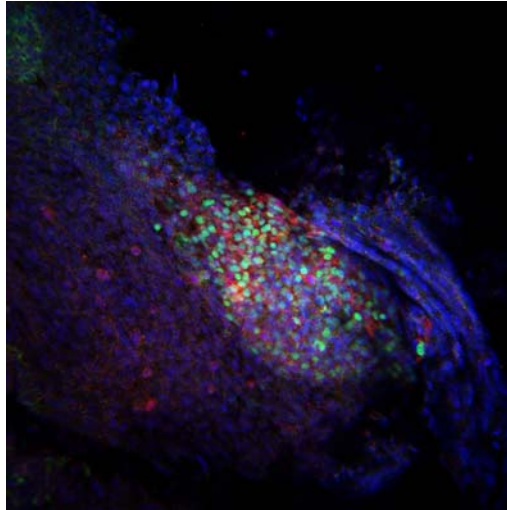
SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [K]iPS4F-8 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES



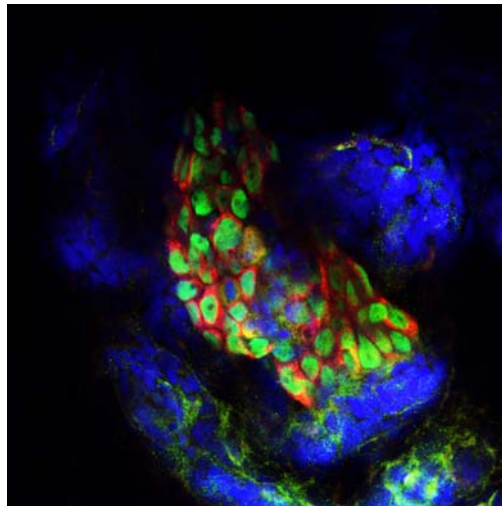
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 3

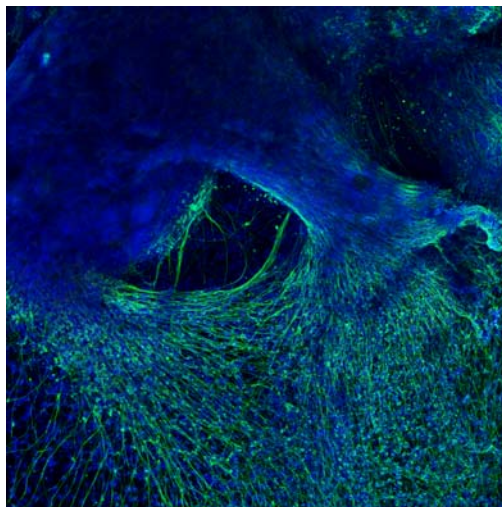
Diferenciación *in vitro* [K]iPS4F-8



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para α -actina y Gata4.

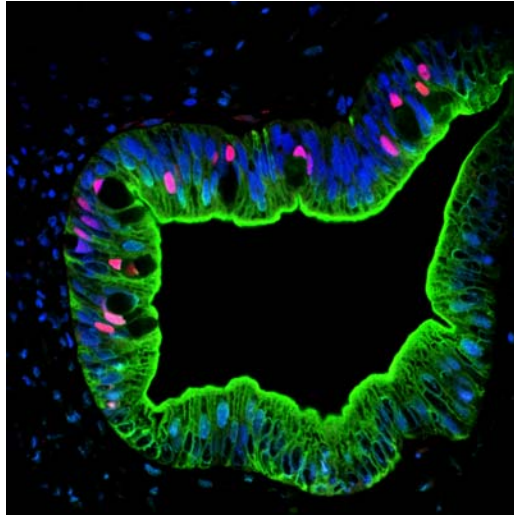


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para α -fetoproteína y FoxA2

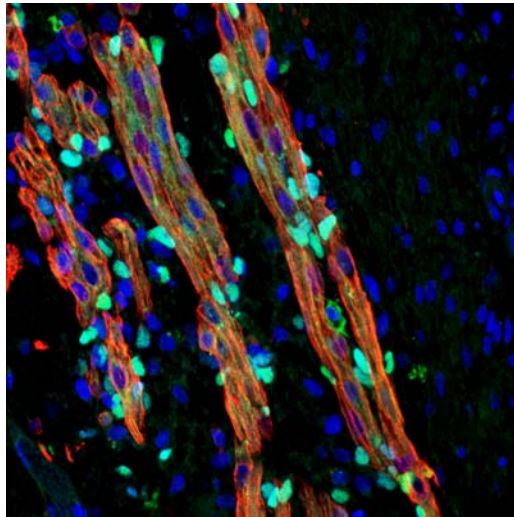


Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para GFAP y Tuj1

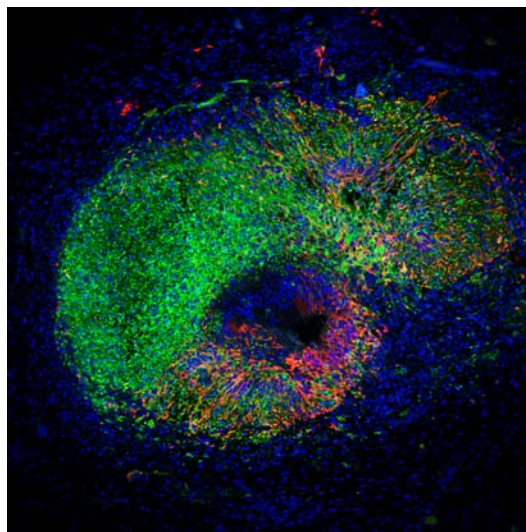
Anexo 4 Diferenciación *in vivo* [K]iPS4F-8



Diferenciación *in vivo* a endodermo. Tejido positivo para α -fetoproteína y FoxA2.



Diferenciación *in vivo* a mesodermo. Tejido positivo para Pax7 y ASA.



Diferenciación *in vivo* a ectodermo. Tejido positivo para GFAP y Tuj1.