

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: HKiPS4F

Name of the line: HKiPS4F

Investigador principal: Juan Carlos Izpisúa Belmonte, Anna Veiga Lluch, Trond Aasen

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 Trond Aasen	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

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Keratinocitos de pelo <i>Hair keratinocytes</i>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Keratinocitos de pelo <i>Hair keratinocytes</i>	
Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <i>Fresh</i> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> 1.04.2008	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 1.04.2008
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 1.04.2008	

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)

Se usó un pelo de una mujer de 30 años. Se puso en medio HBSS y se cortó la parte externa dejando el bulbo y extrajo también la envoltura externa de la raíz. Se cultivó sobre Matrigel en medio condicionado de MEFs. Los keratinocitos proliferaron a partir de la zona de la raíz pero no se observó proliferación a partir del bulbo. Se pasaron los keratinocitos aislados a una nueva placa de Matrigel, donde todas las células se diferenciaron rápidamente excepto las que sufrieron nuestra infección retroviral mediante los siguientes factores de transcripción: OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc.

Used a single hair plucked from a 30-year-old woman. The hair was placed in HBSS medium and cut the external part leaving the bulb and outer root sheath was cut off. Cultured in MEF-conditioned hES medium on matrigel-coated dishes keratinocytes proliferate out of the outer root sheet area of the plucked hair, whereas no cells were observed growing from the bulb area. Keratinocytes isolated were split once into another matrigel-coated dish, which resulted in rapid differentiation of all cells unless subjected to our retroviral spinfection protocol as previously described, using the following transcription factors: OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc.

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),
MEF (mouse embryonic fibroblasts)
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	13	+	
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	29	+	
Cariotipo		29	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	TH	13	+	α -feto proteina	13	+	α - actinina	13	+
Anexo 3	Tuj1	13	+				troponina 1	13	+
<i>In vitro</i>	<i>TH</i>	<i>13</i>	<i>+</i>	<i>α-feto protein</i>	<i>13</i>	<i>+</i>	<i>α- actin</i>	<i>13</i>	<i>+</i>
<i>Annex 3</i>	<i>Tuj1</i>	<i>13</i>	<i>+</i>				<i>troponina 1</i>	<i>13</i>	<i>+</i>
In vivo/ in vivo p 29 (Anexo 4)	Método: formación de teratomas en ratones SCID					Resultado: +			
	<i>Method: teratoma formation in SCID mice</i>					<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. 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

p33

¿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.

<p>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> <p style="text-align: right;">Fecha/ Date: 21/05/2010</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p style="text-align: center;"></p> <p style="text-align: right;">Fecha/ Date: 21/05/2010</p>
<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</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Dr. Aiguader, 88, 7^a planta 08003. Barcelona.</p>	<p>Teléfono /Telephone: +34 93 316 03 00</p> <p>Fax: +34 93 316 03 00</p> <p>E-mail: com@cmrb.eu</p>