

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)
National Bank of Stem Cell Lines
IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS HUMANA
Application Form to Register and Deposit of an human iPS cell line

FECHA: 23/06/2015

DOCUMENTOS QUE DEBEN ACOMPAÑAR LA SOLICITUD:

Attached documents:

- Copia de la autorización del proyecto en el cual se genera la línea celular, junto con informe favorable del Comité Ético del centro de procedencia.**
A copy of the project authorization in which the cell line is obtained along with a favourable report of the Clinical Research Ethics Committee
- Copia de cualquier publicación científica relacionada con la línea iPS generada.**
A copy of any relevant published scientific papers related to the iPS cell line generated
- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).**
A one page CV for the Principal Investigator

SECCIÓN 1-INFORMACIÓN DE LA MUESTRA ORIGINAL Y DE LA iPS GENERADA.

Section 1-Information of the original cell line and the generated iPS

Nombre de la línea iPS <i>Name of the iPS line:</i>	[PD]FiPS031-4F-1
Muestra original donada. Detallar tipo de célula, tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica de la que se obtiene la línea original. Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial <i>Original sample donated. Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained. If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Fibroblastos procedentes de Telethon Biobank (FFF-031/FFF0322010), procedentes de un paciente con Enfermedad de Parkinson. Fibroblasts from Telethon Biobank (FFF-031/FFF0322010), from a patient with Parkinson's disease.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Masculino/male 48
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Parkinson's disease <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i>
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) SNCA A53T <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i>

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 01.10.2012	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 3.04.2011
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Medio de cultivo/ Culture media: IMDM + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). 37°C- 5%CO2
¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase? <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	Si, p7 Yes, p7
Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados. <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos procedentes de un paciente (SNCA A53T) usando una infección retroviral con los siguientes factores de transcripción: Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc. Vectores utilizados: pMX-FLAG-Oct4VP16-Orange, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc y pMSCV-FLAG-hSOX2. The induced pluripotent stem cell line (iPS) has been generated with fibroblasts from a patient (SNCA A53T) using a retroviral infection with the selected transcription factors: Oct-4, Sox2, Klf-4 and c-Myc. Vectors used: pMX-FLAG-Oct4VP16-Orange, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc and pMSCV-FLAG-hSOX2.
Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPSC Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Support: 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), 10 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).
Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros) <i>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)</i>	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.
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	La congelación de los clumps de colonias se ha realizado en FBS(90%) + DMSO(10%), mediante congelador programable (-0.5°C/min.). Los viales se han descongelado a 37°C durante unos minutos The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by a programmable freezer (-0.5°C/min.). Vials were thawed at 37°C for some minutes.

<p>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15) <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>p9-p18</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No No <input type="checkbox"/> Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>

SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA iPS.
Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

Section 2 iPS Cell Line characterization results. Attach results (images and graphics) as an annex

Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i>	Método Comentarios	Marcador	Nº pase	Resultado	
Anexo 1 Annex 1	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n.</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Oct 4	Inmunocitoq.		+	
	Nanog	Inmunocitoq.		+	
	Sox 2	Inmunocitoq.		+	
	SSEA3	Inmunocitoq.		+	
	SSEA4	Inmunocitoq.		+	
	TRA-1-60	Inmunocitoq.		+	
	TRA-1-81	Inmunocitoq.		+	
	Fosfatasa. Alk	Actividad		+	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método Comentarios	Marcador	Nº pase	Resultado	
	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunocitoq. Tuj1		+	
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunocitoq. GATA4 / AAS		+/- +	
	Endoderm <i>Endoderm</i>	Inmunocitoq. AFP / FOXA2		+/-+	
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i>	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 sobre células PA6 (ver Anexo 2).				
Description of the differentiation characteristics in vitro <i>(spontaneous/induced)</i>	Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27on PA6 cells (see Annex 2).				

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Marcador <i>Marker</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>Inmunohistoq.</td> <td>GFAP</td> <td></td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>Inmunohistoq.</td> <td>ASMA / ASA</td> <td></td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>Inmunohistoq.</td> <td>AFP / FOXA2</td> <td></td> <td>+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunohistoq.	GFAP		+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunohistoq.	ASMA / ASA		+		Endodermo <i>Endoderm</i>	Inmunohistoq.	AFP / FOXA2		+	
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																				
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunohistoq.	GFAP		+																					
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunohistoq.	ASMA / ASA		+																					
Endodermo <i>Endoderm</i>	Inmunohistoq.	AFP / FOXA2		+																					
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Inyección intratesticular en ratones SCID de 4•10 mill de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo (Anexo 3).</p> <p>4-10 mill of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. After 8 weeks, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</p>																								
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46 XY p4</p>																								
<p>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i></p>	<p>Los marcadores de microsatélites de los fibroblastos originales coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 5)</p> <p>Microsatellites markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 5).</p>																								
<p>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>La qPCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc (Anexo 6)</p> <p>Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc was shown by qPCR (Annex 6).</p>																								

<p>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Se evidenció el silenciamiento de los 4 genes de reprogramación: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (Anexo 6)</p> <p>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown (Annex 6)</p>
<p>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i></p>	<p>La línea de iPSC generada presenta la mutación A53T en el gen SNCA, que también presentan los fibroblastos de los que procede (Anexo 7)</p> <p>The iPSC line shows the A53T mutation in SNCA as the fibroblasts from origin (Annex 7)</p>
<p>Test de micoplasma Mycoplasma Test</p>	<p>Negativo por PCR (Anexo 8)</p> <p>Negative by PCR (Annex 8)</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga Lluch</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> CMRB. Doctor Aiguader, 88, 08003, Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona</p>	<p>Teléfono (phone): 933160360</p> <p>Fax: 933160301</p> <p>E-mail: blc@cmrb.eu</p>

SECCIÓN 4 **INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)**
Section 4 *Additional information (optional)*

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 5 DECLARACIÓN

Confirmando 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>  Fecha / Date: 23/06/2015 	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha /Date 23/06/2015
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Margarita Sala Azón, Gerente  Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA NIF G-63687222	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona	Teléfono /Telephone: 933160303 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu