

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: 21 Diciembre de 2016

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>	LVNC-FiPS-MIB1VF2
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>	Muestra obtenida a partir de fibroblastos humanos de dermis de brazo. Sample obtained from human forearm skin dermal fibroblasts
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Varón, 52 Male, 52
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) LVNC <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) LVNC <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i>

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input 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> 14 Marzo 2013	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 14 Marzo 2013
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 fibroblastos humanos de piel/ Culture media human skin fibroblast: DMEMGlutaMAX +10%FBS+0.5%Penicilin-Streptomycin (Gibco, Life Technologies)
¿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>	Sí; pase 2 Yes; passage 2
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>	Generamos células humanas pluripotentes inducidas (iPS) a partir de fibroblastos de donante con cardiomiopatía no compactada del ventrículo izquierdo y mutación en el nucleótido G2827T del exon 20 del gen MIB1, que cambia el aminoácido Val943Phe, siguiendo el protocolo descrito en Raya et al., 2009 (ver anexo, bibliografía). Brevemente, la reprogramación de fibroblastos se llevó a cabo con dos rondas de infección retroviral de los factores OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC. A los 30-60 días se identificaron colonias similares a las de células iPS. We generated human induced pluripotent stem cells (iPS) using dermal fibroblasts from skin biopsies from left ventricular non compaction cardiomyopathy donor with a mutation on nucleotide G2827T in exon 20 that changes amino acid Val943Phe, following the protocol described in Raya et al., 2009 (See Annex; bibliography). Briefly, the fibroblast reprogramming was carried out using two rounds of retroviral infection of OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC. iPS-like colonies appeared from day 30-60.
Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Soporte: monocapa de fibroblastos dérmicos humanos inactivos. Medio de Cultivo: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium suplementado con 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco, Life technologies), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, Life technologies), 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peprtech), 1% non-essential amino acids (Gibco, Life Technologies), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, Life technologies) y 0,5% Penicillin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). Support: inactive human dermal fibroblast monolayer. Culture medium: Knockout Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco, Life technologies), 0,05mmol/l 2-mercaptoethanol (Gibco, Life technologies), 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peprtech), 1% non-essential amino acids (Gibco, Life Technologies), 20% Knockout Serum Replacement (Gibco, Life technologies) and 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</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 sizes of 1-3 mm of diameter. They have several forms and smooth edges. High nucleus/cytoplasm ratio.

<p><i>characteristics of the line in culture (form and size of the colonies; form and size of the cells; nucleus/cytoplasm ratio; others)</i></p>	
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Los fragmentos de colonias levantadas mecánicamente desde la monocapa de fibroblastos dérmicos se congelaron en 90% suero fetal bovino (FBS) suplementado con 10% DMSO en un contenedor de isopropanol a -80°C (1°C/min.). Los viales se descongelaron rápidamente a 37°C</p> <p>The clumps of colonies mechanically detached from dermal fibroblast monolayer were cryopreserved in 90% fetal bovine serum (FBS) supplemented with 10% DMSO by isopropanol container at -80°C (1°C/min). Vials were thawed quickly at 37°C.</p>
<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>pase 5</p> <p>passage 5</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>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>	Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Anexo1 Annex1	Oct 4	qPCR/inmuncitoq		6-7	+/+	
	Nanog	qPCR/inmuncitoq		6-7	+/+	
	Sox 2	qPCR		6	+	
	SSEA3	en su lugar: KLF4/CRIPTO/REX1 (qPCR)		6	+/+/+	
	SSEA4	inmuncitoq		7	+	
	TRA-1-60					
	TRA-1-81	inmuncitoq		7	+	
	Fosfatasa. Alk	actividad/activity		6	+	
Test de diferenciación <i>in vitro</i>	Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
<i>In vitro differentiation test</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmuncitoq	Tuj1	11	+	Anexo 2/Annex2
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmuncitoq	SMA	11	+	Anexo 2/Annex2
	Endoderm <i>Endoderm</i>	Inmuncitoq	AFP	11	+	Anexo 2/Annex2
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i> <i>(spontaneous/induced)</i>	<p>Anexo 2. Generamos cuerpos embrioides como describe Giorgetti et al., 2009: Medio de endodermo: KODMEM (Gibco, Life Technologies), 10% FBS, 2mM Glutamax (Gibco, Life Technologies), 0.1 mM 2-β-mercaptoethanol, non-essential amino acids, and penicillinstreptomycin. Medio mesodermo: Medio endodermo + ácido ascórbico (0.5mM). Medio ectodermo: N2/B27 (Thermofisher scientific)</p> <p>Annex 2. We generated embrioid bodies as described in Giorgetti et al., 2009 endoderm medium: KODMEM (Gibco, Life Technologies), 10% FBS, 2mM Glutamax (Gibco, Life Technologies), 0.1 mM 2-β-mercaptoethanol, non-essential amino acids, and penicillinstreptomycin. Mesoderm medium: endoderm medium + ascorbic acid (0.5mM). Ectoderm medium: N2/B27 medium (Thermofisher scientific)</p>					

<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><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>HE</td> <td>p12</td> <td></td> <td>identificado/identified (Anexo3/Annex3)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>HE</td> <td>p12</td> <td></td> <td>identificado/identified (Anexo3/Annex3)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>HE</td> <td>p12</td> <td></td> <td>identificado/identified (Anexo3/Annex3)</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	HE	p12		identificado/identified (Anexo3/Annex3)		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	HE	p12		identificado/identified (Anexo3/Annex3)		Endodermo <i>Endoderm</i>	HE	p12		identificado/identified (Anexo3/Annex3)	
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>																				
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	HE	p12		identificado/identified (Anexo3/Annex3)																					
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	HE	p12		identificado/identified (Anexo3/Annex3)																					
Endodermo <i>Endoderm</i>	HE	p12		identificado/identified (Anexo3/Annex3)																					
<p>Descripción de las características de diferenciación in vivo <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>Anexo 3. Se inyectaron células de la línea LVNC-FiPS-MIB1VF2 en ratones beige SCID (inmunodeficiencia severa, Charles River Laboratories) tal como se describe en Aasen et al., 2009. Los ratones inmunocomprimidos generaron teratomas intra-testiculares complejos.</p> <p>Annex 3. Cell from LVNC-FiPS-MIB1VF2 line were injected in beige SCID mice (severe immunodeficiency, Charles River Laboratories) as described in Aasen et al., 2009. Immunodeficient mice generated intra-testicular complex theratomas.</p>																								
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>Anexo 4 /Annex 4 46,Xy p12, p22</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>Anexo 5. 9 loci de repeticiones cortas en tandem (SRT), más Amelogenina para determinar el sexo fueron amplificadas mediante PCR con el kit GenePrint 10 (Promega) La línea celular fue analizada con un ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Los datos se analizaron usando un software Osiris v2.6 (NCBI,NIH).</p> <p>Annexe 5. 9 short tandem repeat (STR) loci, plus Amelogenin for gender determination, were PCR amplified with the GenePrint 10 kit (Promega). The cell line sample was subsequently analysed using an ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer. Data were analyzed using Osiris v2.6 software (NCBI, NIH). TH01: 8, 9.3;D21S11: 29, 30;D5S818: 11,13;D13S317: 12,13;D7S820: 8, 9;D16S539: 12, 13;CSF1PO: 11, 12;AMEL: X, Y;vWA: 14, 16;TPOX: 8</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>Anexo 6. La integración y silenciamiento de los transgenes retrovirales (OCT4, KLF4, SOX2, MYC) se confirmó a través de q-RTPCR. La integración se confirmó con la reexpresión de genes de pluripotencia endógenos mediada por los transgenes retrovirales. Los transgenes se consideraron silenciados cuando el nivel de expresión era inferior al 3% de la expresión génica de GAPDH.</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>Annex 6. Integration/silencing of retroviral transgenes (OCT4, KLF4, SOX2, MYC) was confirmed by qRT-PCR. Integration was confirmed with reexpression of endogenous pluripotency genes by retroviral transgenes. Transgenes were considered silenced when expression levels were less than 3% of GAPDH expression levels</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>Anexo 7. La secuenciación del ADN genómico de la línea LVNC-FiPS-MIB1VF2 mostró un doble pico G/T en el nucleótido 2827 del exon 20 del gen de MIB1 indicando heterocigosis</p> <p>Annex 7. Sequencing of genomic DNA from LVNC-FiPS-MIB1STOP1 line showed double peak G/T in nucleotide 2827 corresponding to exon 20 of MIB1 gene, indicating heterozygosity.</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Anexo 8. La línea LVNC-FiPS-MIB1VF2 fue analizada mediante PCR y resultó estar libre de micoplasma</p> <p>Annex 8. LVNC-FiPS-MIB1VF2 line was analyzed by PCR and resulted free from mycoplasma</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> José Luis de la Pompa Mínguez</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid SPAIN</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC)</p>	<p>Teléfono (phone): +34-91-4531334</p> <p>Fax: +34-91-4531240</p> <p>E-mail: jlpompa@cnic.es</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):

Las líneas iPS se generaron en colaboración con el grupo del Dr. Angel Raya en el IBEC (Barcelona).

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.

<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>Fecha/ Date: 22/12/2016</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>José Luis de la Pompa Mínguez</p>  <p>Fecha /Date 21/12/2016</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Alberto Sanz Belmar, Gerente</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Melchor Fernández Almagro, 3. Madrid 28029</p>	<p>Teléfono /Telephone:</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail:</p>