

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 a human iPS cell line

FECHA: 13.07.2017

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>	[IDDM1] FiPS 1.13-Ep6F-9
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.</i> <i>Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained.</i> <i>If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Fibroblastos procedentes de biopsia de piel <i>Fibroblasts from skin biopsy</i>
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Masculino, 38 años Male, 38 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) diabetes tipo1 No Yes (specify) type1 diabetes
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> (especificar) No Yes (specify)

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> 3.7.2013	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 26.10.2015
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 + 1% 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>	p4 x 3
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>	<p>Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos (p6) de un paciente con Diabetes tipo 1, mediante la nucleofección con Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofactor kit (Lonza, #VPD-1001) y vectores episomales con expresión ectópica de 6 factores de transcripción (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, Addgene #27077; pCXLE-hSK, Addgene #27078; pCXLE-hUL, Addgene #27080). En paralelo se nucleofectaron fibroblastos con el plásmido pCXLE-EGFP (Addgene # 27082) y las células se recogieron tras 72h para calcular la eficiencia de nucleoinfección y como control positivo para las PCRs.</p> <p><i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts (p6) of a Type 1 Diabetes, by nucleofection with Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofactor kit (Lonza, #VPD-1001) and episomal vectors with ectopic expression of 6 transcription factors transcripción (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, Addgene #27077; pCXLE-hSK, Addgene #27078; pCXLE-hUL, Addgene #27080). In parallel fibroblasts were nucleofected with a plasmid carrying EGFP (pCXLE-EGFP, Addgene # 27082) and cells were collected after 72h to calculate efficiency of nucleofection and as a positive control for PCRs.</i></p>
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>	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).

<p>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></p>	<p>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.</p> <p><i>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.</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>La congelación de los clumps de colonias se ha realizado en FBS (90%) + DMSO (10%), mediante congelador programable (-0.5°C/min.) o mediante contenedor de isopropanol a -80°C (-1°C/min.). Los viales se han descongelado 37°C mediante descongelación rápida.</p> <p><i>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS (90%)+ DMSO (10%), by programmable freezer (-0.5°C/min.) or by isopropanol container at -80°C (-1°C/min). Vials were thawed quickly at 37°C.</i></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>p17-22</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>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results Comments</i>	
Anexo Annex 1	Comentarios				
	Oct 4	inmunocitoq	14		+
	Nanog	inmunocitoq	14		+
	Sox 2	inmunocitoq	14		+
	SSEA3	inmunocitoq	14		+
	SSEA4	inmunocitoq	14		+
	TRA-1-60	inmunocitoq	14		+
	TRA-1-81	inmunocitoq	14		+
	Fosfatasa. Alk	actividad	13		+
Test de diferenciación <i>In vitro differentiation test</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results Comments</i>	
	Comentarios				
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq. Tuj1 /GFAP	15		+/+
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq. ASMA/ASA	15		+/+
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocitoq. AFP/ FOXA2	15		+/+
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	<p>Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo de EBs suplementado con ácido ascórbico.</p> <p>Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio de EBs</p> <p>Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 (ver Anexo 2).</p> <p><i>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in EB medium supplemented with ascorbic acid.</i></p> <p><i>Endoderm: EBs culture in EB medium</i></p> <p><i>Ectoderm: EBs culture in N2/B27 medium (see Annex 2).</i></p>				

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="558 224 718 257">Comentarios</th> <th data-bbox="718 224 845 257">Método</th> <th data-bbox="845 224 1005 257">Marcador</th> <th data-bbox="1005 224 1165 257">Nº pase</th> <th data-bbox="1165 224 1476 257">Resultado</th> </tr> <tr> <th data-bbox="558 280 718 313"><i>Comments</i></th> <th data-bbox="718 280 845 313"><i>Method</i></th> <th data-bbox="845 280 1005 313"><i>Marker</i></th> <th data-bbox="1005 280 1165 313"><i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1165 280 1476 313"><i>Results</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="558 347 718 414">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="558 436 718 504">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="558 526 718 593">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Comentarios	Método	Marcador	Nº pase	Resultado	<i>Comments</i>	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>					Mesodermo <i>Mesoderm</i>					Endodermo <i>Endoderm</i>				
Comentarios	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																						
<i>Comments</i>	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>																						
Ectodermo <i>Ectoderm</i>																										
Mesodermo <i>Mesoderm</i>																										
Endodermo <i>Endoderm</i>																										
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>																										
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>46 XY, p12, p22 (Anexo3/Annex3)</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 la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada. (Anexo 4)</p> <p><i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)</i></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>El análisis mediante QRT-PCR mostró la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC, en fibroblastos control no-nucleofectados y presencia de plásmidos en fibroblastos control nucleofectados con GFP tras 72h tras nucleofección (Anexo 5).</p> <p><i>The absolute quantitative real time PCR showed absence of episomal plasmids in iPSCs and non-nucleofected fibroblasts and presence of plasmids in GFP nucleofected control fibroblasts 72h after nucleofection (Annex 5).</i></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>La QRT_PCR evidenció los niveles de expresión de mRNA de marcadores de pluripotencia endógenos (CDS) y de p53 y EBNA-1 de fibroblastos control nucleofectados con GFP 72h tras nucleofección (pla) (Anexo 5)</p> <p><i>PCR showed mRNA expression levels of endogenous pluripotency markers (CDS) and no expression of transgenes (pla) and as control p53 and EBNA-1 expression of GFP nucleofected control fibroblasts 72h after nucleofection (Annex 5).</i></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>No procede</p> <p><i>Not required</i></p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Negativo por PCR (Anexo 6)</p> <p><i>Negative by PCR (Annex 6)</i></p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Gran Via de l'Hospitalet 199, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona</p>	<p>Teléfono (phone): 93 3160360</p> <p>Fax: 93 31603601</p> <p>E-mail: blc@cmrb.eu</p>

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Rosa Gasa</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> C/Rosselló 149-153 08036 Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)</p>	<p>Teléfono (phone): 93 2275400 ext. 4552</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: rgasa@clinic.cat</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):

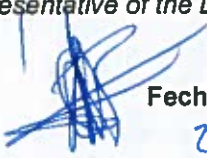

Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

SECCIÓN 5 DECLARACIÓN

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>Fecha/Date: 25/07/2017</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha/Date: 25/07/17</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Angel Raya. Director</p>	
<p>Dirección Postal: Postal Address: Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: 93 3160320 Fax: 93 3160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>

<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>Fecha/Date:</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha/Date: 17/7/17</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Elías Campo, Director</p>	
<p>Dirección Postal: Postal Address: C/Rosselló 149-153 Barcelona 08036</p>	<p>Teléfono /Telephone: +34 93 3129444 Fax: E-mail: direccio@idibaps.org</p>