

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: 11/01/2018

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>	6PNF_SiPSrv_PM_2
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 original: Neurofibroma Plexiforme localizado en pierna Se disgrega el tumor en el laboratorio y se establece cultivo primario de Células de Schwann para reprogramación. Original sample: Plexiform Neurofibroma located in a leg. The tumor is digested in the laboratory and primary Schwann cell cultures are established for reprogramming.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino 33 años Female 33 years old
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Neurofibromatosis Tipo 1 <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) c2946delT;pLeu983 in NF1 gene <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> November 9, 2011	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> November 26, 2014
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 para células de Schwann / Schwann cell Culture Media DMEM high glucose supplemented with 10%FBS (Invitrogen) + 2 mmol/l GlutaMAX + 0,5% Penicillin-Streptomycin + 0.5uM Forskolin (Sigma) + 0.5nM IBMX (Sigma) + 2.5ug/ml insulin (Sigma) + 10nM herregulin-b1 (Peprtech) 37°C 10%CO2
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	Method: AmpFISTR Identifier Plus PCR Amplification Kit (Life Technologies) Sample: 6PNF-TUMOR AmpFISTR Identifier loci Alleles CSF1PO 10,12 D2S1338 17,23 D3S1358 16,18 D5S818 11,13 D7S820 11 D8S1179 10,12 D13S317 11,14 D16S539 9,13 D18S51 11,13 D19S433 13;14 D21S11 29,30.2 FGA 21,27 THO1 7,9.3 TPOX 9,11 vWA 17 Amelogenin (gender) X
¿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, p2-p4 Yes, p2-p4
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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Generación de células de pluripotencia inducidas (iPSC) a partir de cultivo primario de células de Schwann (p3) provenientes de un Neurofibroma Plexiforme de un paciente con Neurofibromatosis de tipo 1, mediante transducción retroviral de 4 factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc). Los plásmidos retrovirales utilizados son pMSCV_PURO_hOct4; pMSCV_PURO_hSox2; pMSCV_PURO_hKlf4 and pMSCV_PURO_cMycT58A. The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from Plexiform Neurofibroma derived Schwann cells (p3) from a Neurofibromatosis type 1 patient, by retroviral infection with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc). The retroviral vectors used are the following: pMSCV_PURO_hOct4; pMSCV_PURO_hSox2; pMSCV_PURO_hKlf4 and pMSCV_PURO_cMycT58A

<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></p>	<p>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), 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> <p>Support: Matrigel (Corning BV). Culture medium: mTeSR Basal Medium Kit (StemCell Technologies)</p>
<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>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.</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 a 37°C mediante descongelación rápida.</p> <p>Colony clumps 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.</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>P8</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input type="checkbox"/></p> <p>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 <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	
	Oct 4 Immunocitoq.	9	+		
	Nanog Immunocitoq.	9	+		
	Sox 2 Immunocitoq.	9	+		
	SSEA3 Immunocitoq.	9	+		
	SSEA4 Immunocitoq.	9	+		
	TRA-1-60				
	TRA-1-81 Immunocitoq.	9	+		
	Fosfatasa. Alk Actividad	2	+		
	ver Anexo 2/See Annex 2				
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
	Ectodermo Immunocitoq.	TUJ1/GFAP	12	+	
	<i>Ectoderm</i>				
	Mesodermo Immunocitoq.	SMA/GATA4	12	+	
	<i>Mesoderm</i>				
	Endodermo Immunocitoq.	AFP/FOXA2	12	+	
	<i>Endoderm</i>				
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> (espontánea/inducida) <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides (EBs) en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico y suero bovino fetal. Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio de cultivo con suero bovino fetal. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 (ver Anexo 3). Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in medium supplemented with ascorbic acid and fetal bovine serum. Endoderm: EBs culture in medium supplemented with fetal bovine serum. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 3).				

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="427 185 596 241">Comentarios</th> <th data-bbox="596 185 730 241">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="730 185 865 241">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="865 185 1034 241">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1034 185 1217 241">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1217 185 1407 241">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="427 309 596 376">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="427 421 596 488">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="427 533 596 600">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Comentarios	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>						Mesodermo <i>Mesoderm</i>						Endodermo <i>Endoderm</i>					
Comentarios	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>																									
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,XX passage 4 See Annex 4</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 del tumor coinciden con los de la línea iPS generada. (Anexo 5) Microsatellite markers of the tumor sample are identical to the generated 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>qPCR para la detección de los 4 genes: Oct4, Sox2, Klf-4 c-myc (Anexo 6). qPCR to detect the 4 genes: Oct4, Sox2, Klf-4 c-myc (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 factores exógenos de reprogramación (oct4, Sox2, Klf-4 and c-myc) mediante qRT-PCR (ver anexo 6).</p> <p>Silencing of the reprogramming exogenous factors (Oct4, Sox2, Klf-4 and c-myc) has been shown by qRT-PCR (see 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>Mutación germinal confirmada (ver anexo 7) Mutación somática del tumor no detectada</p> <p>Germinal mutation confirmed (see Annex 7) Tumor somatic mutation not detected</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Negativo por PCR Negative by PCR</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Eduard Serra Arenas</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Ctra. Can Ruti, camí escoles s/n 08916 Badalona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP)</p>	<p>Teléfono (phone): (+34) 93 554 3067 Fax: (+34) 93 465 1472 E-mail: eserra@igtp.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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departament / Centre / Legal Representative of the Department / Centre)</i>  Dr. Manel Puig Domingo Institut de Recerca Germans Trias i Pujol CIF: G-60805462 Fecha/ Date: 11/01/2018 	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Dr. Eduard Serra Arenas  Fecha /Date 11/01/2018
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Dr. Manel Puig Domingo</i> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP) Carretera de Can Ruti, camí de les escoles s/n 08916 Badalona Barcelona	Teléfono /Telephone: 934978653 Fax: 934978654 E-mail: igtp@igtp.cat