

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>	3PNF_SiPSsv_MM_11
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 cuello/espalda. Se disgrega el tumor en el laboratorio y se establece cultivo primario de Células de Schwann para reprogramación. Original sample: Plexiform Neurofibroma located in the back/neck 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 8 años Female 8 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 Type 1 No Yes (specify)
¿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) Germinal mutation: C3943C>T;pGln1315* No Yes (specify)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	<p style="text-align: center;"> Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i> </p>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> December 03, 2010	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>	Soporte/ Coating: 0.1mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma) + 4µg/ml laminin (Invitrogen) 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 + 0.5µM Forskolin (Sigma) + 0.5nM IBMX (Sigma) + 2.5µg/ml insulín (Sigma) + 10nM Herregulin-b1 (Peprotech) 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: 3PNF-TUMOR AmpFISTR Identifier loci Alleles CSF1PO 11, 14 D2S1338 17, 24 D3S1358 15, 16 D5S818 10, 11 D7S820 10 D8S1179 10, 14 D13S317 8, 13 D16S539 9, 12 D18S51 13, 15 D19S433 12, 14, 2 D21S11 30, 32.2 FGA 21, 24 THO1 8, 9.3 TPOX 8 vWA 16 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 pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de cultivo primario de células de Schwann (p4) provenientes de un Neurofibroma Plexiforme de un paciente con Neurofibromatosis de tipo 1, mediante la infección con virus sendai (CytoTune –iPS 2.0 Sendai reprogramming kit, A16517 life technologies) con expresión ectópica de 4 factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc). The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from Plexiform Neurofibroma derived Schwann cells (p4) from a Neurofibromatosis type 1 patient, by sendai viral infection (CytoTune –iPS 2.0 Sendai reprogramming kit, A16517 life technologies) with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc).

<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, 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> <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 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.	8	+		
	Nanog Immunocitoq.	8	+		
	Sox 2 Immunocitoq.	8	+		
	SSEA3 Immunocitoq.	8	+		
	SSEA4 Immunocitoq.	8	+		
	TRA-1-60				
	TRA-1-81 Immunocitoq.	8	+		
	Fosfatasa. Alk Actividad	1	+		
	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 <i>Ectoderm</i>	Immunocitoq.	TUJ1/TH	12	+	
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Immunocitoq.	SMA/GATA4	12	+	
Endoderm <i>Endoderm</i>	Immunocitoq.	a-FETO/FOXA2	12	+	
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 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).				
<i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	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="432 152 592 241">Comentarios</th> <th data-bbox="592 152 735 241">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="735 152 879 241">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="879 152 1023 241">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1023 152 1426 241">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1426 152 1586 241">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="432 241 592 383">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 383 592 495">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 495 592 607">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>	46, XX (Anexo 4/ Annex 4) passage 16																								
<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 coinciden con los de la línea de iPS generada. (Anexo 5)</p> <p>Microsatellite markers of the initial sample are identical than the markers of 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>Extracción genómica de DNA y PCR con primers específicos para la detección de la ausencia de secuencias del virus sendai (Anexo 6).</p> <p>Extraction of genomic DNA and PCR with specific primers to detect absence of sendai virus sequences (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>Extracción genómica de DNA y PCR con primers específicos para la detección de los factores de reprogramación (Anexo 6).</p> <p>Extraction of genomic DNA and PCR with specific primers to detect absence of reprogramming factors (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 en el gen NF1. Mutación somática confirmada en el gen NF1. Ver anexo 7</p> <p>Germinal mutation confirmed in the NF1 gene. Somatic mutation confirmed in the NF1 gene. See Annex 7</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):

Note that there is also available another iPS line generated from the same patient (3PNF_FiPSsv_PM_2). This line was established from primary tumor dermal fibroblasts derived from the same Plexiform Neurofibroma and carries only the germline mutation in the NF1 gene.

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 Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i> Dr. Manel Puig Domingo  11/01/2018 	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Dr. Eduard Serra Arenas  11/01/2018 Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Dr. Manel Puig Domingo <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