

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>	[ctrl.PD]FiPS005-4F-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 del Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (CRicm UPMC INSERM UMR-S975) (39155 3895 FPD SAL PAL 125 005). Procedentes de una donante sana hermana de un paciente con Enfermedad de Parkinson que presenta la mutación PINK1 Q456Xhom y a partir del cual se generó la línea [PD]FiPS006-4F-11. Fibroblasts from Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (CRicm UPMC INSERM UMR-S975) (39155 3895 FPD SAL PAL 125 005). The fibroblasts come from a donor who is sister of a patient with Parkinson's disease that shows the PINK1 Q456Xhom mutation. The line [PD]FiPS006-4F-11 was generated from this patient.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino /female 56
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Hermana de afecto Enf. Parkinson <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 type="checkbox"/> (especificar) <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> 05.04.2011	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 29.04.2011
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, p5-p7 yes, p5-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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Se ha producido la línea de células iPSc a partir de fibroblastos (la donante es hermana de un paciente de E.Parkinson), usando una infección retroviral con los siguientes factores de transcripción: Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc. Vector utilizado pMSCV modificado que permite la expresión de proteínas FLAG_tagged N-terminal. Vectores usados: pMSCV-FLAG-hOCT4, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc, pMSCV-FLAG-hSOX2. We have produced this iPSc cell line from fibroblasts (the donor is the sister of a patient with Parkinson disease), using a retroviral infection with the selected transcription factors: Oct-4, Sox2, Klf-4 and c-Myc. Vectors used: pMSCV-FLAG-hOCT4, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc, 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, 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).
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 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>p11-p29</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.	ASA	+	
	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 data-bbox="432 152 751 219">Método</th> <th data-bbox="751 152 911 219">Marcador</th> <th data-bbox="911 152 1070 219">Nº pase</th> <th data-bbox="1070 152 1444 219">Resultado</th> </tr> <tr> <td data-bbox="432 219 751 286">Comentarios <i>Method</i></td> <td data-bbox="751 219 911 286"><i>Marker</i></td> <td data-bbox="911 219 1070 286"><i>Passage n</i></td> <td data-bbox="1070 219 1444 286"><i>Results</i></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 286 751 353">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 353 751 421">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="432 421 751 600">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </thead></table>	Método	Marcador	Nº pase	Resultado	Comentarios <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>			
Método	Marcador	Nº pase	Resultado																		
Comentarios <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 XX Anexo 3 Annex 3</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>Microsatellites markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)</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 5)</p> <p>Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc was shown by qPCR (Annex 5)</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 5)</p> <p>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown (Annex 5)</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 generada no presenta ninguna mutación o deleción en el exon7 (Anexo 7).</p> <p>The obtained line does not present any point mutation nor deletion on exon 7 (Annex 7)</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></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 (CMRB)</p>	<p>Teléfono (phone): 933160360</p> <p>Fax: 933160361</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

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 (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre  Fecha / Date: 23/06/2015 	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator  Fecha /Date: 23/06/2015
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Margarita Sala Azón, Gerente 	
Dirección Postal: Postal Address: Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB) Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona	Teléfono /Telephone: 933160300 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu