

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA EMBRIONARIA-FETAL

Application Form for the Registration and Deposit of an Embryonic-Fetal Cell Line

FECHA: 10/11/2015

DOCUMENTOS QUE DEBEN ACOMPAÑAR LA SOLICITUD:

Attached documents:

- ☒ **Copia de la autorización del proyecto en que se deriva la línea celular, junto con informe favorable del Comité Ético del centro de procedencia.**
A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval
- ☒ **Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.**
A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line
- ☒ **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 LÍNEA GENERADA.

Section 1-Information of the original cell line and the generated.

Nombre de la línea <i>Name of the line:</i>	HS181 EGFP-2A-RUNX1c (HS181 pRRL-EF1a-EGFP-2A-RUNX1c-PGK-Neo)	
Origen de la línea celular: <i>Origin of the cell line:</i>	Embrionario ☒ <i>Embryonic</i>	Fetal ☐ <i>Fetal</i>
Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i>	Modificación genética de la línea celular embrionaria humana HS181, desarrollada previamente por el Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia) y cedida a nuestro grupo de investigación. Genetic modification from HS181 hESC line, previously developed by the Karolinska Institutet (Stockholm, Sweden) and transferred to our research group.	
¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética? <i>Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?</i>	NO ☒ SÍ ☐ (especificar) <i>No Yes (specify)</i>	
Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco ☐ <i>Fresh</i>	Crioconservado ☒ <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la obtención/generación de la muestra biológica <i>Date of obtaining/generation of the biological sample</i>	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> Mayo 2011 May 2011	

Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	
Descripción general del procesamiento previo de la muestra biológica de origen (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal, ...) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample, ...)</i>	La Línea HS181 fue obtenida del Karolinska Institutet tras la aprobación del comité pertinente para la ejecución del proyecto Implicación de los Factores Transcripcionales hematopoyéticos RUNX1 y SCL en la diferenciación de las células embrionarias humanas a linaje hematopoyético. Las células fueron cultivadas tal y como se describe en la bibliografía adjunta (Real PJ et al. Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53). HS181 cell line was obtained from the Karolinska Institutet after the approval by the corresponding ethic committee for the execution of the project entitled: Implication of the hematopoietic transcription factors RUNX1 and SCL in hematopoietic differentiation from hESCs. Cells were cultured as described in the bibliography (Real PJ et al Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53).
En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado <i>If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method</i>	Se utilizó la línea HS181 generada previamente por el Karolinska Institutet como se describe en Hovatta O et al . Human Reprod 2003; 18: 1404-09. Se generó a partir de un stock de pase 54 de línea celular HS181 parental. HS181 hES cell line was generated by the Karolinska Institutet as described in Hovatta O et al . Human Reprod 2003; 18: 1404-09. HS181 EGFP-2A-SCL was derived from p37 from the original HS181 hES cell line.
Condiciones de cultivo y método utilizado en el proceso de derivación. <i>Culture conditions and method used in the derivation process</i>	Soporte: Células stem mesenquimales humanas irradiadas (ihMSCs). Medio Cultivo: KO-DMEM suplementado con 20% KO Serum Replacement, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM L-glutamina, 0.1 mM β-mercaptoetanol y 4 ng/ml bFGF. Las HS181 EGFP-2A-RUNX1c fueron mantenidas en ihMSCs hasta su estabilización y caracterización. Las iPSCs también han sido adaptadas a cultivo libre de feeders en matrigel (Corning BD) con medio condicionado de ihMSCs +4 ng/ml bFGF. Feeders: Irradiated human mesenchymal stem cells (ihMSCs). Culture medium: KO-DMEM supplemented with 20% KO Serum Replacement, 1% non-essential amino acids, 1 mM L-glutamine, 0.1 mM β-mercaptoethanol and 4 ng/ml of bFGF. HS181 EGFP-2A-RUNX1c cells have been cultured over ihMSCs until stabilization and characterization. iPSCs had been also adapted to feeder-free cultures on matrigel (Corning BD) with ihMSCs condition medium+4 ng/ml bFGF.
Condiciones de cultivo de la línea de ESc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>Culture conditions of the ESc line generated (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Las células fueron cultivadas tal y como se describe en la bibliografía adjunta (Real PJ et al. Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53) Cells were cultured as described in the bibliography (Real PJ et al Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53).

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>	Células pequeñas y apretadas con una alta relación núcleo/citoplasma y un nucléolo prominente, que crecen en colonias circulares con bordes definidos. Small, tightly packed cells with a high nucleus/cytoplasm ratio and prominent nucleoli, circular colonies growing with defined edges.
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Método de congelación: Las colonias de HS181 EGFP-2A-RUNX1c son levantadas, peleteadas y resuspendidas en primer lugar en 0,5ml de suero bovino fetal (SBF) pre-enfriado y después en 0,5ml de SBF con 20%DMSO pre-enfriado. La congelación se realiza de manera gradual utilizando contenedores para congelación conteniendo isopropanol a -80°C. Método de descongelación: La descongelación se realiza introduciendo el vial congelado en un baño de agua a 37°C. Cuando la muestra está casi descongelada, se pasa la solución a medio de cultivo atemperado (10 volúmenes), se centrifuga (1200rpm, 3 min.) y el pellet se pone en cultivo con su medio correspondiente. Freezing method: HS181 EGFP-2A-RUNX1c colonies are splited, pelleted and resuspended first in 0,5ml of pre-chilled fetal bovine serum (FBS) and then in 0,5ml of pre-chilled FBS with 20%DMSO solution. Freezing process takes place in a gradual manner using freezing container with isopropanol from RT to -80°C. Thawing method: Thawing process takes place in a fast manner, putting the crioial in a water bath at 37°C. When the solution is almost thawed, add a 10x volume of pre-warmed medium, centrifugate the mix (1200rpm, 3 min.) and cultivate the pellet in the appropriate medium.
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>	
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes ☒ No No ☐ Comentarios/ Comments:	¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes ☐ No ☒ Resultado / Result Realizamos una selección policlonal. We performed a polyclonal selection.

SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA. Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

Section 2 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>N results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
	Oct 4	qPCR y Citometría de Flujo/	p 15 /	Positivo	
	Nanog	qPCR/	p15 /	Positivo	
	Sox 2	qPCR/	p15 /	Positivo	
	SSEA3	Citometría de Flujo/	p 15 /	Positivo	
	SSEA4	Citometría de Flujo/	p 15 /	Positivo	
	TRA-1-60	Citometría de Flujo/	p 15 /	Positivo	
	TRA-1-81	Citometría de Flujo/	p 15 /	Positivo	
	Fosfatasa. Alk				

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>				
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Citometría de flujo/	CD31, CD34, CD45/	pases 10-30/	Positivo
	Endodermo <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>	La diferenciación inducida hacia linaje hematopoyético está descrita en la bibliografía adjunta (Real PJ et al Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53). Induced hematopoietic differentiation is described in Real PJ et al Molecular Therapy 2012; 20(7):1443-53.
---	---

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo 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>	Imunohistoquímica/ GFAP/ p17 / Positivo			
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Imunohistoquímica/ Vimentina/ p17 / Positivo			
	Endodermo <i>Endoderm</i>	Imunohistoquímica/ CKAE1AE3/ p17/ Positivo			
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	Se inyectaron HS181 EGFP-2A-RUNX1c por vía subcutánea en flancos dorsales de ratones NOD-SCID. 12-16 semanas post-inyección, los teratomas fueron fijados e incluidos en parafina. El examen histológico de las preparaciones de hematoxilina-eosina mostró diferenciación hacia las tres capas germinales (Anexo 4). HS181 EGFP-2A-RUNX1c cells were injected subcutaneously into dorsal flanks of NOD-SCID mice. 12-16 weeks post-injection teratomas were fixed and embedded in paraffin. Histological examination of hematoxinilin-eosin preparations showed differentiation towards the three germ layers (Annex 4).				
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i> <i>cariotípic</i>	46,XX,[15]/46,XX, der(5)t(q35;?)+der(12)t(q11;?)[7] pase 74 (p74) desde que se originó la línea HS181 EGFP-2A-RUNX1c, partiendo de HS181 wt p54 (Anexo 5). 46,XX,[15]/46,XX, der(5)t(q35;?)+der(12)t(q11;?)[7] pass 74 (p74). HS181 EGFP-2A-RUNX1c was generated from HS181 wt p54 (Annex 5).				
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>	Se empleó el análisis de 5 regiones de microsatélites diferentes para la identificación de las células de estudio (HS181 EGFP-2A-RUNXc) con respecto a otra línea transgénica generada al mismo tiempo (HS181 EGFP-2A-SCL) (Anexo 6). 4 loci están ligados al cromosoma X (GATA31E08, DXS6789, GATA175D03 y DXS7132) y un locus ligado al cromosoma Y (DYS390) (Type-it Microsatellite PCR Kit, Qiagen). HS181 EGFP-2A-RUNX1c se encuentran en los carriles 5 y 6, mientras que la referencia se sitúa en las posiciones 7 y 8. 5 independent microsatellites regions were used for cell identity (Annex 6). 4 loci are linked to X chromosome (GATA31E08, DXS6789, GATA175D03 and DXS7132) and another linked to Y chromosome (DYS390) (Type-it Microsatellite PCR Kit, Qiagen). HS181 EGFP-2A-RUNX1c cells were loaded into lanes 5 and 6, while a reference sample was loaded into lanes 7 and 8.				

Confirmación del diagnóstico genotípico de la línea celular generada a partir de muestras con mutación genética <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i>	
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Test de Mycoplasma NEGATIVO determinado por PCR (Anexo 7) Mycoplasma test NEGATIVE as determined by PCR (Annex 7)

SECCIÓN 3
Section 3

DATOS DEL DEPOSITANTE
Applicant Details

Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> PABLO MENENDEZ BUJAN (IJC) PEDRO JOSÉ REAL LUNA (FPS-GENyO) OSCAR NAVARRO MONTERO (FPS-GENyO)	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Carrer Casanova 143. Barcelona 08036. (IJC) PTS-Granada. Avda. Ilustracion 114. Granada 18016. (FPS-GENyO).
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras (IJC) (Pablo Menéndez Buján). Fundación Pública Progreso y Salud-GENyO (Pedro José Real Luna)	Teléfono (phone): 93 5572809/ 958 715500 Fax: 958 637071 E-mail: pmenendez@carrerasresearch.org/ pedro.real@genyo.es/ oscar.navarro@genyo.es

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):

Esta línea celular sobreexpresa el cDNA de EGFP-2A-RUNX1c de manera constitutiva. Esto hace que tenga determinadas propiedades específicas sobre la línea celular parental HS181 de la que procede.

This hES cell line overexpress EGFP-2A-RUNX1c in a constitutive way. This overexpression promotes several functional properties in comparison with the parental hES cell line HS181.

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> José Antonio Lorente 10/11/15 Fecha/ Date:	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Pablo Menendez Buján Pedro José Real Luna Óscar Navarro Montero Fecha /Date 10/11/15
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Director Científico/ Scientific Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO). Avda. de la Ilustración 114 • 18016 Granada Carrer Casanova 143. Barcelona 08036. (IJC)	Teléfono /Telephone: 958 715500/ 93 5572809 Fax: 958 637 071 E-mail: pmenendez@carrerasresearch.org/ pedro.real@genyo.es/ oscar.navarro@genyo.es