

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: 16-02-2017

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>	[AS] FiPS 1-Ep6F-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. <i>Original sample donated.</i> Si son células comerciales, detallar nombre, referencia y distribuidor comercial <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>	Femenino. 25 años <i>Female, 25 years</i>
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Síndrome de Alport No Yes (specify) Alport Syndrome
¿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) gene COL4A3 No Yes (specify) mutation: c.[345delG]; [345delG], p.[P116Lfs*37], Exon6 / Homocystosis
Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> Fresh Cryopreserved

Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 9.07.2015	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 21.10.2015
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	IMDM + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). 37°C- 5%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>	Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada. (Anexo 4) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)</i>
¿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>	p2 x 6
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>	Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos (p6) de un paciente con Síndrome de Alport, mediante la nucleofección con Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofector 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) como control para calcular la eficiencia. <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts (p6) of a patient showing Alport Syndrome, by nucleofection with Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofector kit (Lonza, #VPD-1001) and episomal vectors with ectopic expression of 6 transcription factors (pCXLE-hOct3/4-shp53-F, Addgene #27077; pCXLE-hSK, Addgene # 27078; pCXLE-hUL, Addgene # 27080). In parallel fibroblasts were nucleofected with a control plasmid carrying EGFP (pCXLE-EGFP, Addgene # 27082) to calculate efficiency of nucleofection.</i>
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, 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). Support: Matrigel (Corning BV). Culture medium: mTeSR Basal Medium Kit (StemCell Technologies)
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 aplanas, 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. <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>

Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	<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>
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>	p15-p16
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/>	¿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
Comentarios/ Comments:	

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>
Anexo 1 <i>Annex 1</i>	Oct 4 inmunocitoq. Nanog inmunocitoq. Sox 2 inmunocitoq. SSEA3 inmunocitoq. SSEA4 inmunocitoq. TRA-1-60 inmunocitoq. TRA-1-81 inmunocitoq. Fosfatasa. Alk actividad	14 14 14 14 14 14 14 17	+	
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>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq. ASMA/ASA	15	+
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq. Tuj1/GFAP	15	+
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocitoq. AFP/FOXA2	15	+
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 (ver Anexo 2).			
<i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	<i>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 2).</i>			

Test de diferenciación <i>in vivo</i> <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>
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>
	Endodermo <i>Endoderm</i>
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	46,XX; p9, p16 (Anexo 3/ Annex 3)
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>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>
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	<p>La QRT_PCR evidenció los niveles de expresión de mRNA de marcadores de pluripotencia endógenos (azul) y de p53 y EBNA-1 de fibroblastos control nucleofectados con GFP 72h tras nucleofeción (en verde) (Anexo 5)</p> <p><i>QRT_PCR showed mRNA expression levels of endogenous pluripotency markers and no expression of transgenes (in blue) and as control p53 and EBNA-1 expression of GFP nucleofected control fibroblasts 72h after nucleofection (in green).</i></p>

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	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 nucleofeción (Anexo 5). <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>
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>	La línea de iPS generada presenta la mutación c.[345delG]; [345delG], p.[P116Lfs*37], Exon6 en homizigosis en el gen COL4A3 (Anexo 6) <i>The iPS line shows the mutation c.[345delG]; [345delG], p.[P116Lfs*37], Exon6 in homozygosity, in COL 4A3 gene (Annex 6)</i>
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo por PCR (Anexo 7) <i>Negative by PCR (Annex 7)</i>

SECCIÓN 3
*Section 3***DATOS DEL DEPOSITANTE**
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Roser Torra Balcells	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Fundació Puigvert C/Cartagena 340-350 Barcelona 08025 España
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Fundació Puigvert	Teléfono (phone): +34 93 416 97 00 (ext 4535) Fax: E-mail:

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Bernd Kuebler	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> CMRB. Doctor Aiguader 88 08003, Barcelona.
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB)	Teléfono (phone): 933160360 Fax: 933160301 E-mail: bkuebler@cmrb.eu

SECCIÓN 4
*Section 4***INFORMACIÓN ADICIONAL (OPCIONAL)**
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):

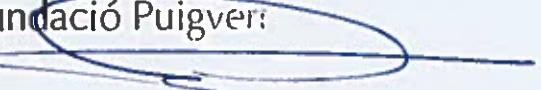
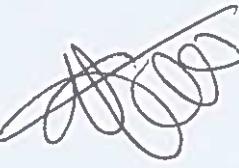
Otras observaciones o información relevantes (a llenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

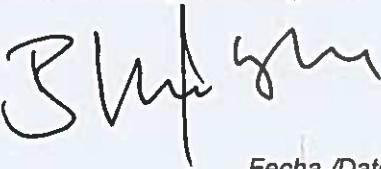
Seguimiento de la línea (a llenar por el BNLC):
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

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>Fundació Puigvert</p>  <p>Fecha / Date: 16-02-2017</p> <p>RAMON MASSAGUER Patró Delegat/Director General</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha / Date 16-02-2017</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Sr Ramon Massaguer Meléndez Patró Delegat/Director General Fundació Puigvert</p>	
<p>Dirección Postal: Postal Address: Fundació Puigvert C/Cartagena 340-350 08025 Barcelona España</p>	<p>Teléfono / Telephone: + 34 93 416 97 31 Fax: E-mail: secredir@fundacio-puigvert.es</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>CMRB [D]</p>  <p>Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA Fecha / Date 16/02/2017</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha / Date: 16/02/2017</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Ángel Raya. Director</p>	

<p>Dirección Postal: Postal Address: CMRB Doctor Aiguader, 88 08003, Barcelona</p>	<p>Teléfono / Telephone: 933160303 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>
---	---