

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_FiPSsv_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 cuello/espalda. Se disgrega el tumor en el laboratorio y se establece cultivo primario de fibroblastos dérmicos del tumor para reprogramación. Original sample: Plexiform Neurofibroma located in the back/neck The tumor is digested in the laboratory and primary tumor dermal fibroblast 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 ☐ SÍ ☒ (especificar) Neurofibromatosis Type 1 No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO ☐ SÍ ☒ (especificar) Germinal mutation: C3943C>T;pGln1315* No Yes (specify)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco ☒ Crioconservado ☐ <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
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>	Medio de cultivo/Culture Media DMEM high glucose supplemented with 10%FBS + 2 mmol/l GlutaMAX + 0,5% Penicillin-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>	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 pluripotencia inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos dérmicos (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 dermal fibroblasts (p4) from a Neurofibromatosis type 1 patient, by sendai virus infection (CytoTune –iPS 2.0 Sendai reprogramming kit, A16517 life technologies) with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc).	

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>	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 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.) o mediante contenedor de isopropanol a -80°C (1°C/min.). Los viales se han descongelado a 37°C mediante descongelación rápida. 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.
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>	P8
¿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

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		Nº pase	Resultado	Comentarios
	<i>Method</i>		<i>Passage n.</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Oct 4	Immunocitoq.	10	+	
	Nanog	Immunocitoq.	10	+	
	Sox 2	Immunocitoq.	10	+	
	SSEA3	Immunocitoq.	10	+	
	SSEA4	Immunocitoq.	10	+	
	TRA-1-60				
	TRA-1-81	Immunocitoq.	10	+	
	Fosfatasa. Alk Actividad		1	+	
	ver Anexo 2/See Annex 2				
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método		Nº pase	Resultado	Comentarios
	<i>Method</i>		<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Ectodermo	Immunocitoq.	TUJ1/TH	13	+
	<i>Ectoderm</i>				
	Mesodermo	Immunocitoq.	SMA/GATA4	13	+
	<i>Mesoderm</i>				
	Endoderm	Immunocitoq.	a-FETO/FOXA2	13	+
	<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. Endoderm: cultivo de cuerpos embrioides en medio de cultivo suplementado 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).				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método</th> <th>Marcador</th> <th>Nº pase</th> <th>Resultado</th> </tr> <tr> <th>Comentarios</th> <th>Method</th> <th>Marker</th> <th>Passage n</th> <th>Results</th> </tr> <tr> <th>Comments</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Método	Marcador	Nº pase	Resultado	Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results	Comments					Ectodermo					<i>Ectoderm</i>					Mesodermo					<i>Mesoderm</i>					Endodermo					<i>Endoderm</i>				
	Método	Marcador	Nº pase	Resultado																																										
Comentarios	Method	Marker	Passage n	Results																																										
Comments																																														
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 (Anexo 4/ Annex 4) passage 16																																													
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>	Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea iPS generada. (Anexo 5) Microsatellite markers of the reprogrammed fibroblasts sample are identical to the generated iPS line (Annex 5)																																													
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	Extracción genómica de DNA y PCR con primers específicos para la detección de la ausencia de secuencias del virus sendai (Anexo 6). Extraction of genomic DNA and PCR with specific primers to detect absence of sendai virus sequences (Annex 6)																																													

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Extracción genómica de DNA y PCR con primers específicos para la detección de los factores de reprogramación (Anexo 6). Extraction of genomic DNA and PCR with specific primers to detect absence of reprogramming factors (Annex 6)
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>	Mutación germinal confirmada. Mutación tumoral somática no detectada Ver anexo 7 Germinal mutation confirmed. Tumor somatic mutation not detected. See Annex 7
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo por PCR Negative by PCR

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

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

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 named 3PNF_SiPSsv_MM_11. This line was established from primary Schwann cells derived from the same Plexiform Neurofibroma and carries both the germline and the tumor somatic 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)

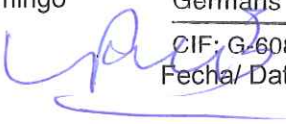
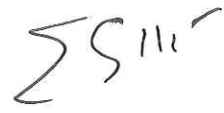
Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):

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/Centre)</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
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: 934978655 Fax: 934978654 E-mail: igtp@igtp.cat