

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: 5/4/2018

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>	PBMC1-iPS4F1 shDLL4
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>	Esta línea celular se ha generado a partir de la línea de iPSCs PBMC1-iPS4F1, ya depositada en el BNLC (http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/fd-lineas-celulares-disponibles/pdf_2016/Documento_Deposito_PBMC1-iPS4F1.pdf). Su origen son células mononucleares de sangre periférica. La línea de iPSC PBMC1-iPS4F1 se ha infectado con lentivirus que expresan short hairpins RNAs dirigidos contra el RNA mensajero del gen humano DLL4, con el fin de suprimir la expresión de esta proteína. This cell line has been generated from the iPSC cell line PBMC1-iPS4F1, already deposited in the BNLC (http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/fd-lineas-celulares-disponibles/pdf_2016/Documento_Deposito_PBMC1-iPS4F1.pdf). Its origin is peripheral Blood Mononuclear cells The iPSC cell line PBMC1-iPS4F1 was infected with lentivirus expressing short hairpin RNAs targeting the human DLL4 gene, in order to suppress its expression..
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO ☒ SÍ ☐ (especificar) <i>No Yes (specify)</i>
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</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 donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i>
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	
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>	STRs AMEL X, X CSF1PO 11, 12 D13S317 11, 12 D16S539 9, 13 D18S51 10, 16 D19S433 12, 14 D21S11 30, 34 D2S1338 17, 17 D3S1358 16, 17 D5S818 11, 12 D7S820 9, 10 D8S1179 13, 16 FGA 18, 22 THO1 7, 9 TPOX 8, 11 vWA 15, 19
¿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>	
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>	Las iPSC fueron generadas con el kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai, un sistema no integrativo que utiliza vectores del virus Sendai. Este kit incluye tres vectores: policistrónico Klf4-hOct3/4-Sox2, cMyc y Klf4. The iPSC were generated with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4.
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>	Se cultivan usando el medio definido, libre de suero, E8 sobre plástico cubierto de Matrigel. Cells are cultured in Matrigel-coated plastic using the serum-free, defined media E8.

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 that grow in circular colonies with defined edges.
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Las colonias de iPSCs se disgregan usando PBS/0.5mM EDTA, se recogen usando medio E8 y se centrifugan a 1000rpm, 3 minutos. El pellet resultante se resuspende en medio de congelación (Medio E8+10% DMSO), y los viales se congelan lentamente a -80°C usando un "Mr Frosty". Tras un mínimo de 24 horas a -80°C los viales se transfieren a nitrógeno líquido. Para la descongelación, los viales se sumergen en un baño a 37°C, y cuando queda una "perla" de liquido congelado se transfiere rápidamente a un tubo con medio de cultivo E8, se centrifuga a 1000 rpm, 3 minutos. El pellet resultante se resuspende con medio E8 suplementado con 10microM Y-27632 para mejorar la supervivencia celular, y se traspasa a un frasco de cultivo con Matrigel. iPSCs colonies are disaggregated using PBS/0.5mM EDTA, harvested with E8 medium and centrifuged at 1000 rpm, 3 minutes. The cellular pellet is then resuspended in freezing medium (E8 medium+10% DMSO), and vials are frozen gradually using a "Mr Frosty" freezing container. After a minimum of 24 hours at -80°C, vials are then transferred to liquid nitrogen. For thawing, vials are submerged in a 37°C water bath and when there is a bead of frozen liquid left, the cells are transferred to a tube with E8 medium and centrifuged at 100rpm, 3 minutes. The pellet is then resuspended in E8 medium supplemented with 10microM Y-27632 to improve cell survival, and transferred to a Matrigel-coated culture flask.
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>	Pase 13+4* (*4 PASES TRAS LA INFECCIÓN CON LOS LENTIVIRUS) Pase 13+4* (*4 PASSAGES AFTER LENTIVIRAL INFECTION)
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes ☒ No No ☐ Comentarios/ Comments: La línea se ha generado mediante la infección con lentivirus que expresan short hairpin RNAs dirigidos contra el RNA mensajero de DLL4. The cell line has been generated by infection with lentiviral vectors expressing short hairpin RNAs targeting DLL4 messenger RNA.	¿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 <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	
	Oct 4	PCR + Citometría de Flujo / POSITIVO/ Ver publicación anexa			
	Nanog	PCR / POSITIVO/ Ver publicación anexa			
	Sox 2	PCR / POSITIVO/ Ver publicación anexa			
	SSEA3	Citometría de Flujo / POSITIVO/ Ver publicación anexa			
	SSEA4	Citometría de Flujo / POSITIVO/ Ver publicación anexa			
	TRA-1-60	Citometría de Flujo / POSITIVO/ Ver publicación anexa			
	TRA-1-81	Citometría de Flujo / POSITIVO/ Ver publicación anexa			
	Fosfatasa. Alk	Microscopía / POSITIVO / Ver publicación anexa			
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>	PCR / PAX6 / POSITIVO / Ver publicación anexa			
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	PCR / KDR / POSITIVO / Ver publicación anexa			
	Endoderm <i>Endoderm</i>	PCR / HNF3A / POSITIVO / Ver publicación anexa			
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i>	Se realizó diferenciación espontánea in vitro, mediante la formación de cuerpos embrionarios (EBs), que fueron cultivados durante 21 días en medio de cultivo sin bFGF (Medio E6). Tras su cultivo, los EBs fueron peletados, y se analizó la expresión de diferentes marcadores de capas generales mediante PCR. In vitro spontaneous differentiation was achieved by embryoid bodies (EBs) formation, cultured for 21 days in culture medium without bFGF (E6 medium). After culture, EBs were pelleted, and we analyzed the expression of germ layer markers using PCR.				

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> <th></th> </tr> <tr> <th>Comentarios</th> <th>Method</th> <th>Marker</th> <th>Passage n</th> <th>Results</th> <th>Comments</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td></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 <u>in vivo</u> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>																																				
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	Pase 13+8* (*8 PASES TRAS LA INFECCIÓN CON LOS LENTIVIRUS) Passage 13+8* (*8 PASSAGES AFTER LENTIVIRAL INFECTION) 47,XX +der(1),t(1;?)																																			
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>	STRs AMEL X, X CSF1PO 11, 12 D13S317 11, 12 D16S539 9, 13 D18S51 10, 16 D19S433 12, 14 D21S11 30, 34 D2S1338 17, 17 D3S1358 16, 17 D5S818 11, 12 D7S820 9, 10																																			
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>																																				

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify</i> <i>method used depending</i> <i>on cell reprogramming)</i>	
Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética <i>Confirmation of</i> <i>genotypic diagnosis of</i> <i>the cell line generated</i> <i>from samples with</i> <i>genetic mutation</i>	
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	SI, NEGATIVO YES, NEGATIVE

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Verónica Ramos Mejía, Verónica Ayllon Cases	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda. de la Ilustración 114 • 18016 Granada
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO)	Teléfono (phone): 958 715 500 Fax: 958 637 071 E-mail: veronica.ramos@genyo.es veronica.avllon@aenvo.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):

En la publicación que se adjunta se muestra como efectivamente la expresión de DLL4 está disminuida en esta línea celular.

In the publication attached to this document we show how DLL4 expression is reduced in this cell line.

Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):

Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

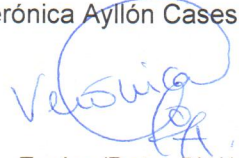
Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):

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) Jose Antonio Lorente   Fecha /Date: 5/4/18	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Verónica Ramos Mejía  Verónica Ayllón Cases  Fecha /Date: 5/4/18
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	Teléfono /Telephone: 958 715 500 Fax: 958 637 071 E-mail: veronica.ramos@genyo.es veronica.ayllon@genyo.es