

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 2-Ep6F-28
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 de biopsia de piel. <i>Fibroblasts from skin biopsy</i>
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	[AS] FiPS 2-Ep6F-28
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Síndrome de Alport <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify) Alport Syndrome</i>
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) gene COL4A5 <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify) mutation: c3722G>A (G1241D)</i>

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input 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> 24.07.2015	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 21.10.2016
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 iPSc generada. (Anexo 4) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPSc 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>	P3 x 11 P6 x 4
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, 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). Support: Matrigel (Corning BV). Culture medium: mTeSR Basal Medium Kit (StemCell Technologies)

<p>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></p>	<p>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.</p> <p><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></p>
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<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>
<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>p15-16</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>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 <i>Method</i>		Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Anexo 1 Annex 1	Oct 4 Nanog Sox 2 SSEA3 SSEA4 TRA-1-60 TRA-1-81 Fosfatasa. Alk	inmunocitoq. inmunocitoq. inmunocitoq. inmunocitoq. inmunocitoq. inmunocitoq. inmunocitoq. actividad	10 10 10 10 10 10 10 16	+ + + + + + +	
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>
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>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq. ASMA/ASA	11	+	
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq. Tuj1/GFAP	11	+	
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocitoq. AFP/FOXA2	11	+	
	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>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 in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="603 185 715 248"> Método <i>Method</i> </th> <th data-bbox="722 185 847 248"> Marcador <i>Marker</i> </th> <th data-bbox="874 185 1007 248"> Nº pase <i>Passage n</i> </th> <th data-bbox="1042 185 1177 248"> Resultado <i>Results</i> </th> <th data-bbox="1241 185 1410 248"> Comentarios <i>Comments</i> </th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="5" data-bbox="448 282 1434 566"> Ectodermo <i>Ectoderm</i> Mesodermo <i>Mesoderm</i> Endodermo <i>Endoderm</i> </td> </tr> </tbody> </table>	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>				
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,XY; p8, p18 (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>	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>										
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	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 nucleofección (en verde) (Anexo 5) <i>QRT_PCR showed mRNA expression levels of transgenes and endogenous pluripotency markers (in blue) and p53 and EBNA-1 expression of GFP nucleofected control fibroblasts (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></p>	<p>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 nucleofección (Anexo 5).</p> <p><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></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 de iPS generada presenta la mutación c3722G>A (G1241D) en el gen COL4A5 (Anexo 6)</p> <p><i>The iPS line shows the mutation c3722G>A (G1241D) in the COL4A5 gene (Annex6).</i></p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Negativo por PCR (Anexo 7) <i>Negative by PCR (Annex 7)</i></p>

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 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.

<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>RAMON MASSAGUER Patró Delegat / Director General</p> <p>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: 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</p> <p>Fax:</p> <p>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 Centre d'Assistència Regenerativa de Barcelona Centro de Asistencia Regenerativa de Barcelona Centre of Regenerat. Medicine in Barcelona</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</p> <p>Fax: 933160301</p> <p>E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [AS] FiPS 2-Ep6F-28 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

Anexo 4: Resultados microsatélites

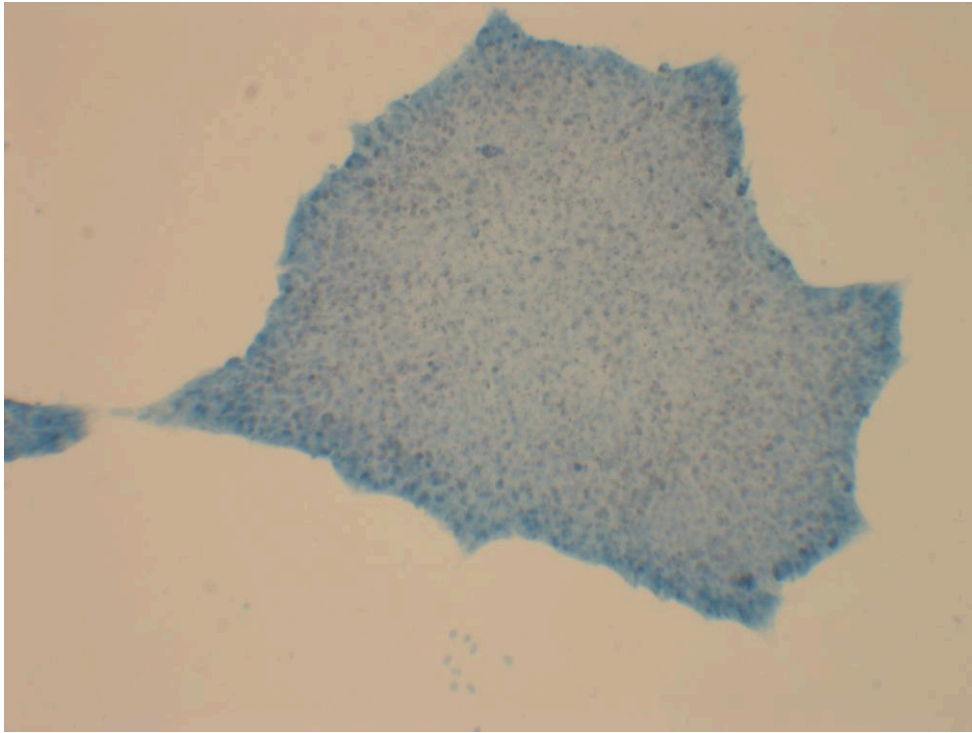
Anexo 5: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 6: Genotipado

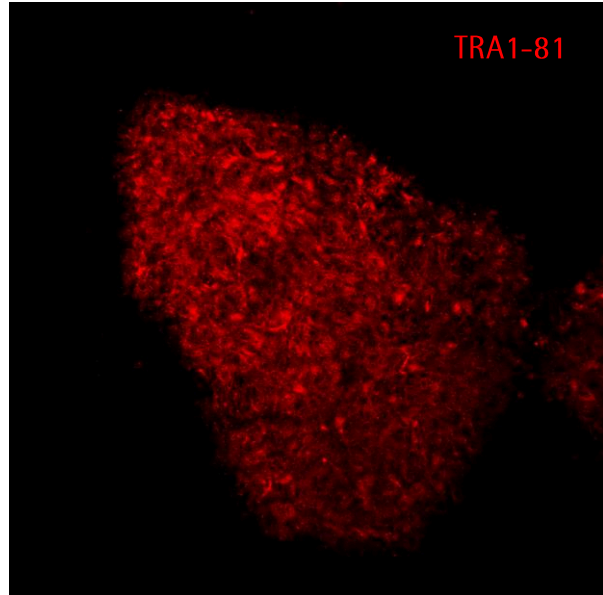
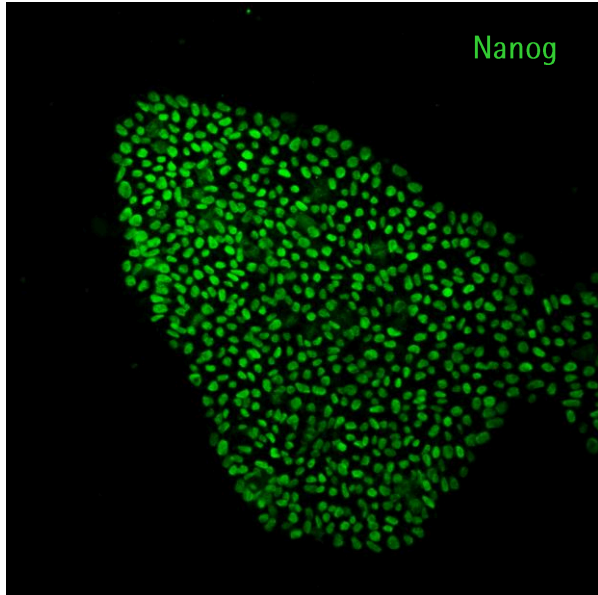
Anexo 7: Resultado Test de micoplasma

Anexo 1

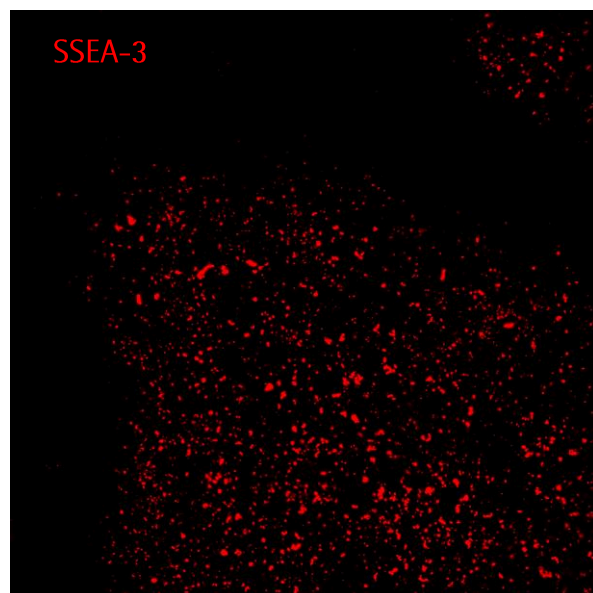
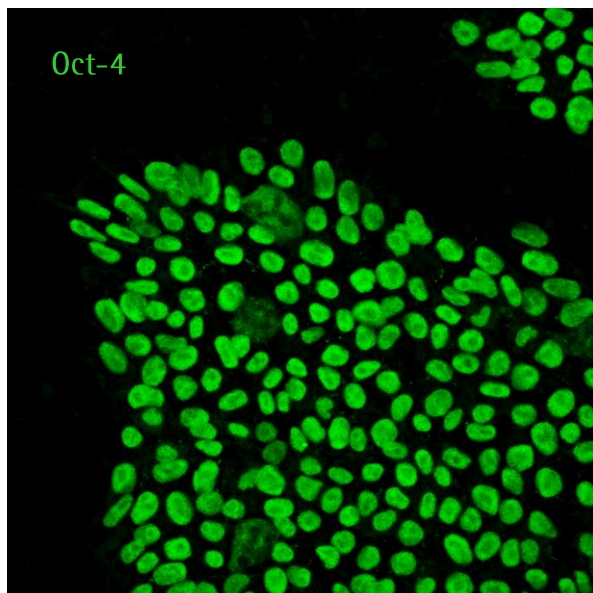
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



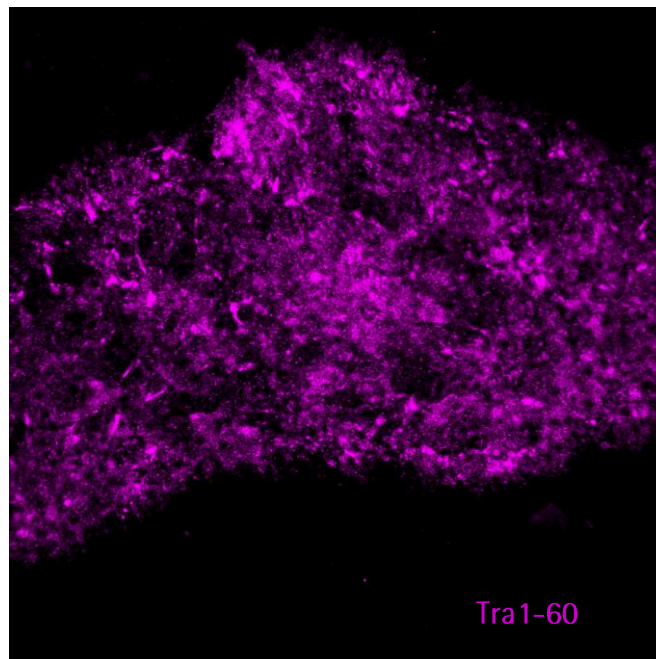
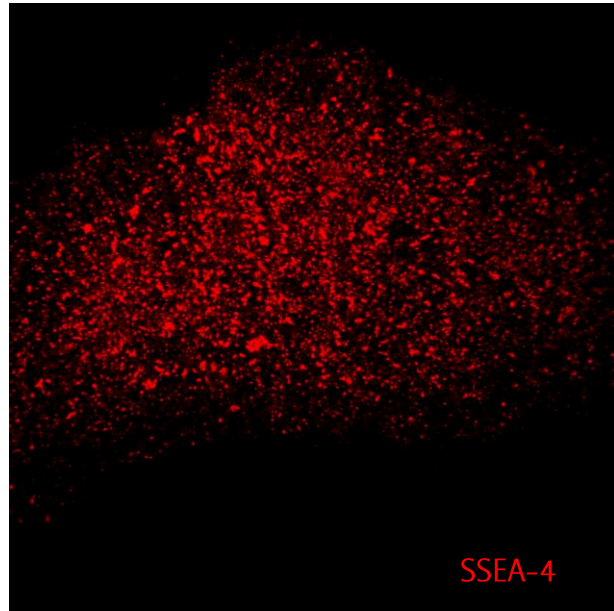
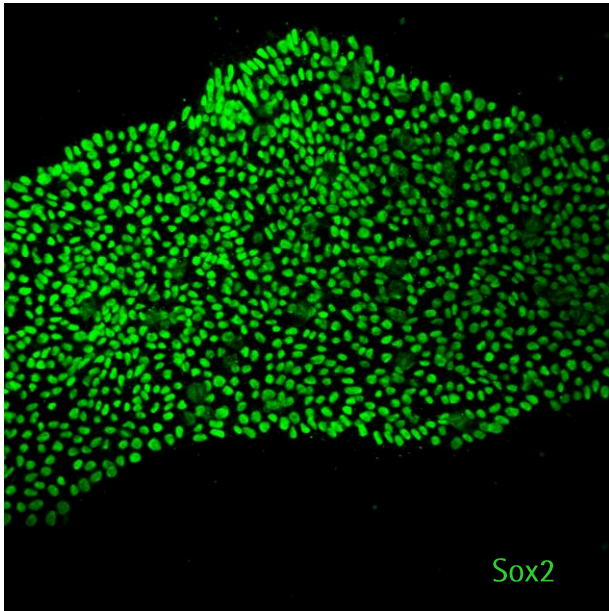
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Nanog y TRA1-81



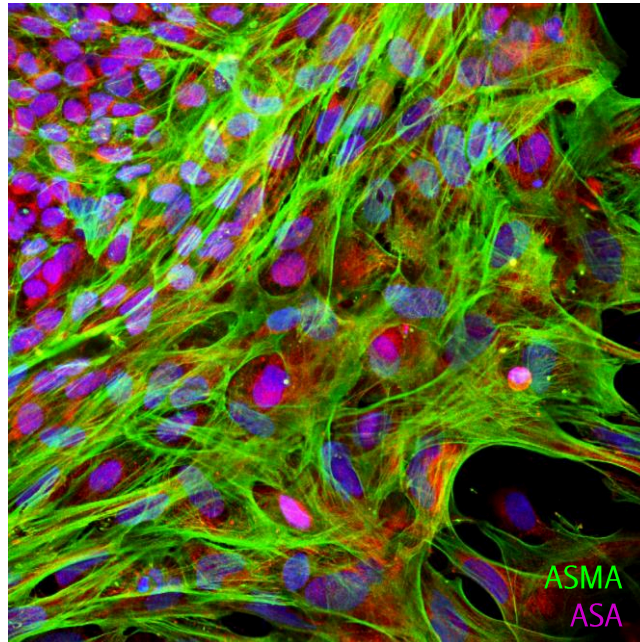
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Oct-4 y SSEA-3



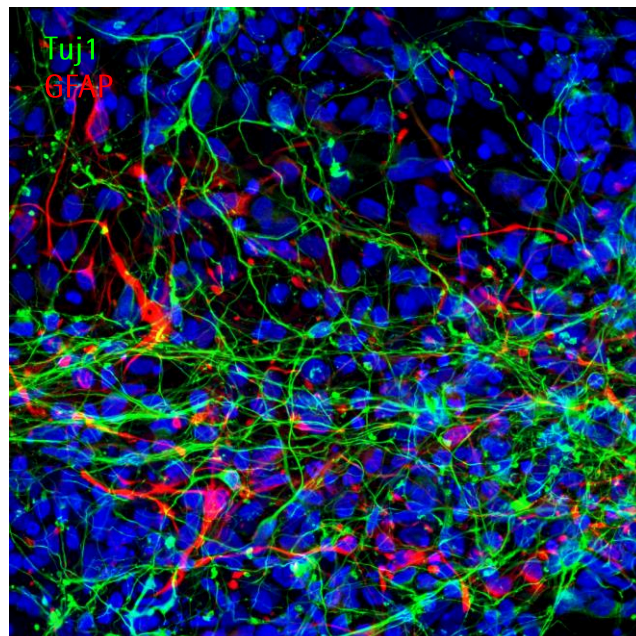
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

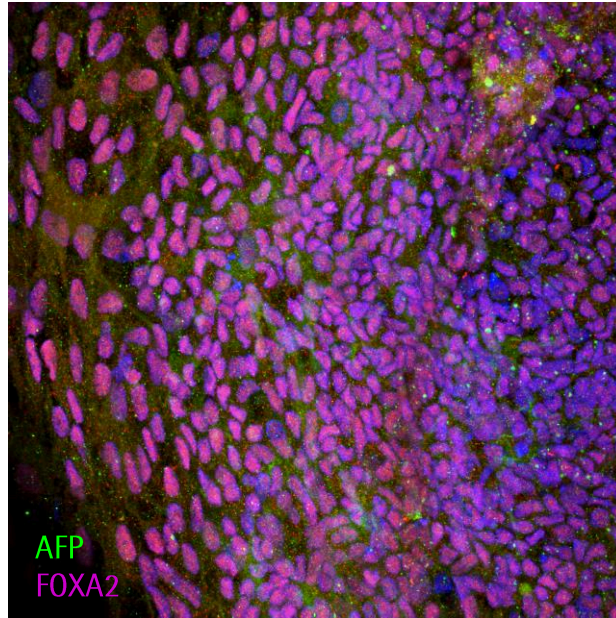
Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASMA y ASA**



Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1 y GFAP**

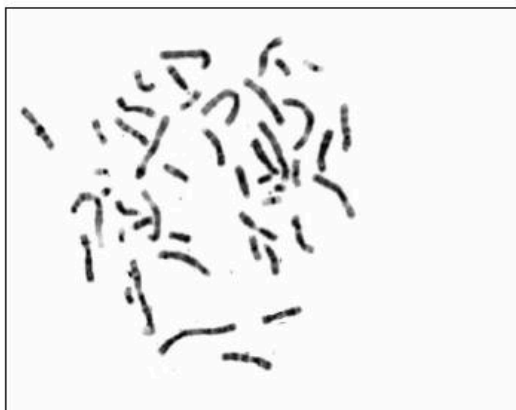
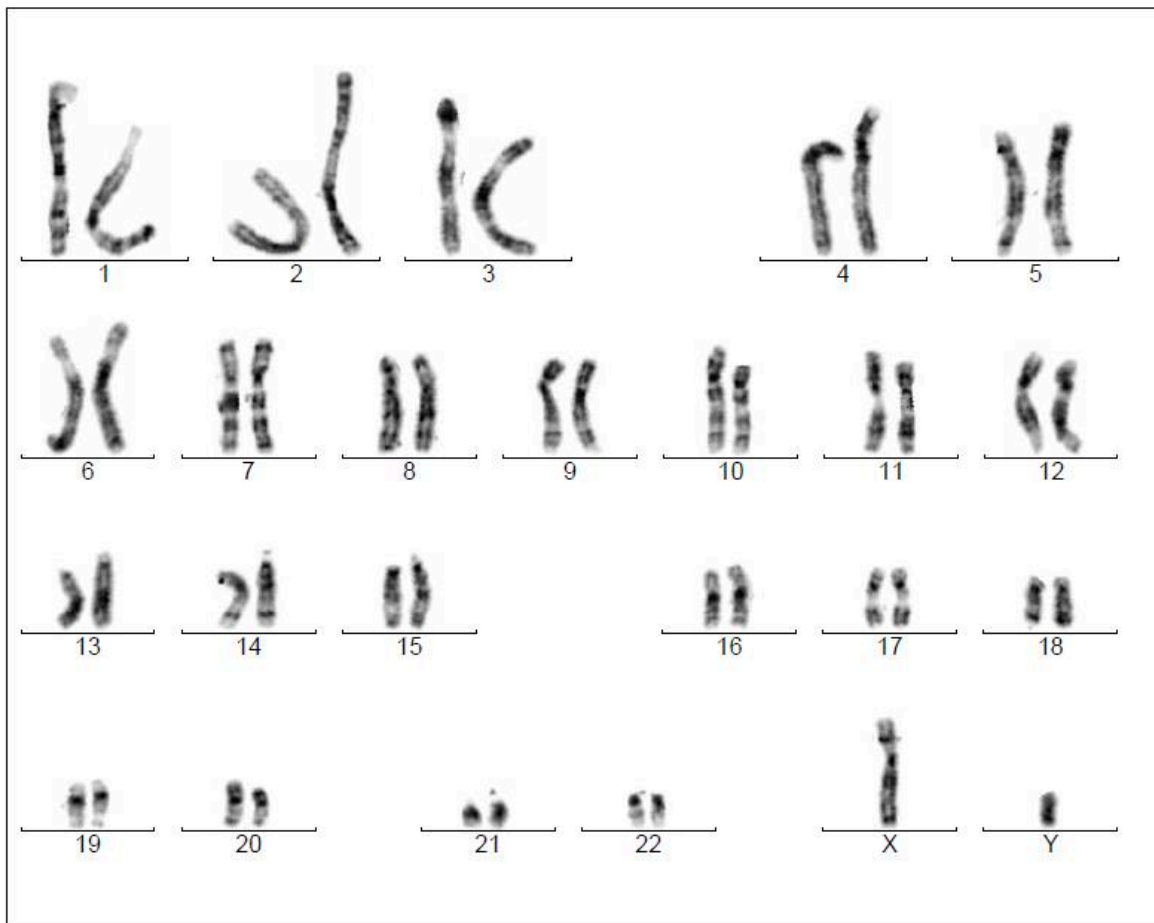


Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP y FOXA2**

Anexo 3

Cariotipo

Cytogenetic analysis



Case name: A179621

Patient name: AS FiPS2-Ep6F-28 p18

Specimen type: stem cells

Result: 46,XY

Anexo 4

Resultado microsatélites



Table 5. The GenePrint® 10 System Allelic Ladder Information.

STR Locus	Label	Size Range of Allelic Ladder Components ^{1,2} (bases)	Repeat Numbers of Allelic Ladder Components
TH01	FL	156–195	4–9, 9.3, 10–11, 13.3
D21S11	FL	203–259	24, 24.2, 25, 25.2, 26–28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36–38
D5S818	JOE	119–155	7–16
D13S317	JOE	176–208	7–15
D7S820	JOE	215–247	6–14 ³
D16S539	JOE	264–304	5, 8–15
CSF1PO	JOE	321–357	6–15
Amelogenin	TMR	106, 112	X, Y
vWA	TMR	123–171	10–22
TPOX	TMR	262–290	6–13

¹The length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analysis.

²When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 600, the calculated sizes of allelic ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allelic ladder and ILS components may cause differences in migration. The dye label also affects migration of alleles.

³HeLa cells have a microvariant allele 13.3 at the D13S317 locus. This will appear as an off-ladder allele (see www.cstl.nist.gov/strbase/var_D13S317.htm#Tri).

Figura 1. Información de la casa comercial Promega sobre la relación entre cada uno de los loci STR amplificados y las repeticiones (en rangos de tamaño y número) que pueden estar presentes en dichos productos de PCR.

RESULTADOS:

A continuación se detalla la correlación entre el código de muestra de Biobanco y la línea celular procesada:

código Biobanco	Línea celular
32160023036	[AS] FiPS2-Ep6F-28 p7

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a los alelos encontrados para cada uno de los marcadores microsatélites analizados.

Línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
[AS] FiPS2-Ep6F-28 p7	X, Y	11	8, 12	11	28, 29	11, 13	12	6, 9.3	9, 12.5	15, 18

Granada, a 21 de Marzo de 2016

Área de Biología Molecular
 Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

A continuación se detalla la correlación entre el código de muestra de Biobanco y la línea celular procesada:

código Biobanco	Línea celular
32160023009	AS 2F p3

En la tabla siguiente se muestran los resultados correspondientes a los alelos encontrados para cada uno de los marcadores microsatélites analizados.

Línea celular	Loci STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
AS 2F p3	X, Y	11	8, 12	11	28, 29	11, 13	12	6, 9.3	9, 12.5	15, 18

Granada, a 28 de Enero de 2016

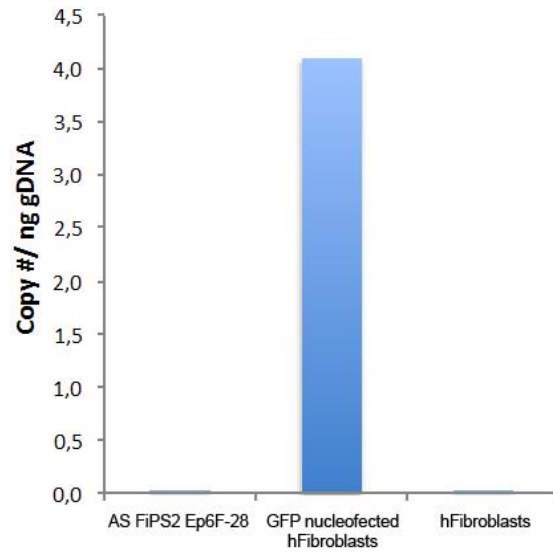


Área de Biología Molecular

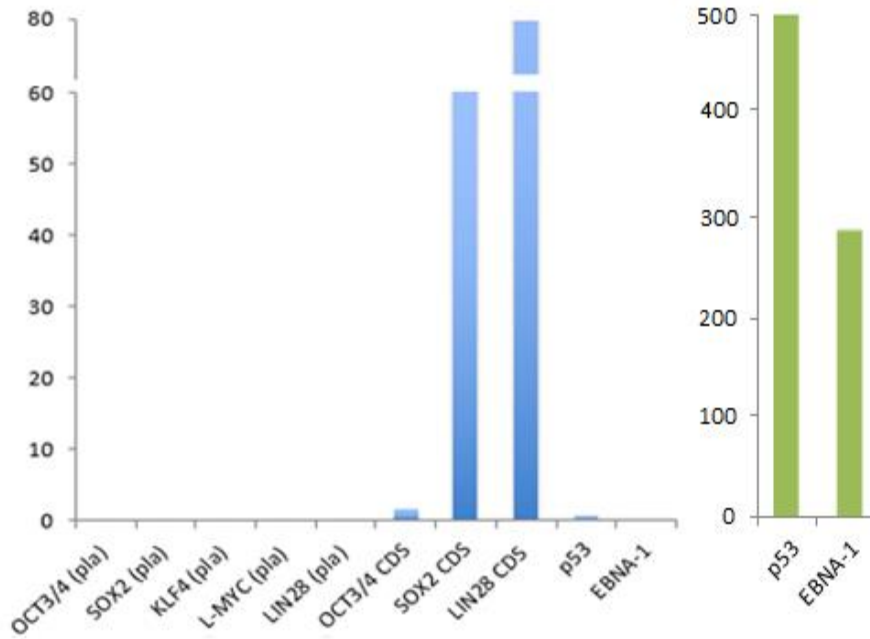
Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [AS] FiPS2-Ep6F-28
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación



QRT-PCR donde se muestra la ausencia de plásmidos episomales en la línea de iPSC y en fibroblastos control no-nucleofectados y la presencia de plásmidos en fibroblastos control GFP-nucleofectados 72h después de la nucleofección



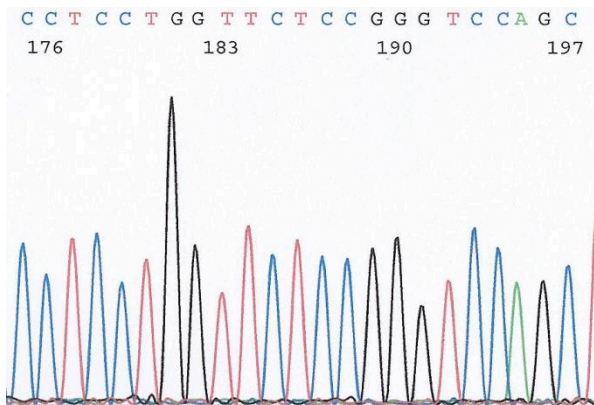
Niveles de expresión de mRNA de transgenes (pla) y marcadores de pluripotencia endógenos (CDS, azul) y expresión de p53 y EBNA-1 de fibroblastos GFP-nucleofectados control 72h después de la nucleofección

Anexo 8

Genotipado

WT exon 41 COL4A5 gene

GCCAAAAGGGTGATGGAGGATTACCTGGGATTCCAGGAAATCCTGGCCTTCCAGGT
CCAAAGGGCGAACCAGGCTTTCACGGTTTCCCTGGTGTGCAGGGTCCCCCAGGCCC
TCC**TG**TTCTCCGGGTCCAGCTCTGGAAGGACCTAAAGGCAACCCTGGGCCCCAAG
GTCCTCCTGGGAGACCAG



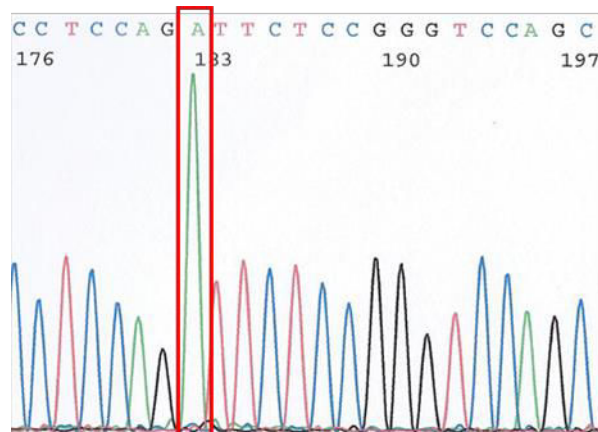
Samples

Mutation COL4A5 gene: c.3722G>A, p.(G1241D) hemizygous

Synonymous change (polymorphism) = c.3720T>A hemizygous

GCCAAAAGGGTGATGGAGGATTACCTGGGATTCCAGGAAATCCTGGCCTTCCAGGT
CCAAAGGGCGAACCAGGCTTTCACGGTTTCCCTGGTGTGCAGGGTCCCCCAGGCCC
TCC**AG**ATTCTCCGGGTCCAGCTCTGGAAGGACCTAAAGGCAACCCTGGGCCCCAAG
GTCCTCCTGGGAGACCAG

AS2-28



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

17-02-2016



5- hiPSC 15056 [AS] FiPS2-Ep6F-28 p7

13- Positive Control

14- Negative Control