

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: 23/06/2015

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>	[ctrl.PD]FiPS005-4F-9
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 del Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (CRicm UPMC INSERM UMR-S975) (39155 3895 FPD SAL PAL 125 005). Procedentes de una donante sana hermana de un paciente con Enfermedad de Parkinson que presenta la mutación PINK1 Q456Xhom y a partir del cual se generó la línea [PD]FiPS006-4F-11. Fibroblasts from Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (CRicm UPMC INSERM UMR-S975) (39155 3895 FPD SAL PAL 125 005). The fibroblasts come from a donor who is sister of a patient with Parkinson's disease that shows the PINK1 Q456Xhom mutation. The line [PD]FiPS006-4F-11 was generated from this patient.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino /female 56
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> No SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Yes (specify) Hermana de afecto Enf. Parkinson
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> No SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Yes (specify)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i>	Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 05.04.2011	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 29.04.2011	
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: IMDM + 10%FBS + 0,5% Penicilin-Streptomycin (Gibco, InVitrogen corporation). 37°C- 5%CO2	
¿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>	si, p5-p7 yes, p5-p7	
Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i> Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados. <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Se ha producido la línea de células iPS a partir de fibroblastos (la donante es hermana de un paciente de E.Parkinson), usando una infección retroviral con los siguientes factores de transcripción: Oct-4, Sox2, Klf-4 y c-Myc. Vector utilizado pMSCV modificado que permite la expresión de proteínas FLAG_tagged N-terminal. Vectores usados: pMSCV-FLAG-hOCT4, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc, pMSCV-FLAG-hSOX2. We have produced this iPS cell line from fibroblasts (the donor is the sister of a patient with Parkinson disease), using a retroviral infection with the selected transcription factors: Oct-4, Sox2, Klf-4 and c-Myc. Vectors used: pMSCV-FLAG-hOCT4, pMSCV-FLAG-hKLF4, pMSCV-FLAG-hcMyc, pMSCV-FLAG-hSOX2.	
Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. <i>(si se describen en publicación, indicar referencia)</i> iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)	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).	
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. 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.). Los viales se han descongelado a 37°C durante unos minutos The clumps of colonies were cryopreserved in FBS(90%)+ DMSO (10%), by programmable freezer (-0.5°C/min.). Vials were thawed at 37°C for some minutes.	

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>	p11-p29
¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input checked="" type="checkbox"/> No <input 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> Anexo 1 Annex 1	Método <i>Comentarios</i>	Marcador	Nº pase	Resultado	<i>Comments</i>
	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n.</i>	<i>Results</i>	
	Oct 4	Inmunocitoq.		+	
	Nanog	Inmunocitoq.		+	
	Sox 2	Inmunocitoq.		+	
	SSEA3	Inmunocitoq.		+	
	SSEA4	Inmunocitoq.		+	
	TRA-1-60	Inmunocitoq.		+	
	TRA-1-81	Inmunocitoq.		+	
	Fosfatasa. Alk	Actividad		+	
Test de diferenciación <i>in vitro</i> <i>In vitro differentiation test</i>	Método <i>Comentarios</i>	Marcador	Nº pase	Resultado	
	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>	<i>Results</i>	<i>Comments</i>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	Inmunocitoq.	Tuj1	+	
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Inmunocitoq.	ASA	+	
	Endoderm <i>Endoderm</i>	Inmunocitoq.	AFP / FOXA2	+/-	
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. Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 sobre células PA6 (ver Anexo 2). Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27on PA6 cells (see Annex 2).				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	Comentarios <i>Method</i>	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comments <i>Comments</i>		
		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>	46 XX 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) Microsatellites markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)							
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	La qPCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc. (Annexo 5) Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-myc was shown by qPCR (Annex 5)							

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	Se evidenció el silenciamiento de los 4 genes de reprogramación: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc. (Anexo 5) Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown (Annex 5)
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 generada no presenta ninguna mutación o delección en el exon7 (Anexo 7). The obtained line does not present any point mutation nor deletion on exon 7 (Annex 7)
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo por PCR (Anexo 8). Negative by PCR (Annex 8)

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Anna Veiga Lluch	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> CMRB. Doctor Aiguader 88 08003 Barcelona
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB)	Teléfono (phone): 933160360 Fax: 933160361 E-mail: blc@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):

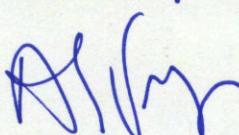
Otras observaciones o información relevantes (a llenar por el BNLC):
Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre)	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator
23/06/2015  CMR[B] Fecha/ Date:	 Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: Margarita Sala Azón, Gerente Dr. Aiguader, 88 Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona 08003 BARCELONA NIF G-63687222	
Dirección Postal: Postal Address: Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB) Doctor Aiguader, 88, 7 ^a planta, 08003, Barcelona	Teléfono /Telephone: 933160300 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu



Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [ctrl.PD]FiPS005-4F-9 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Cariotipo

Anexo 4: Estudio microsatélites

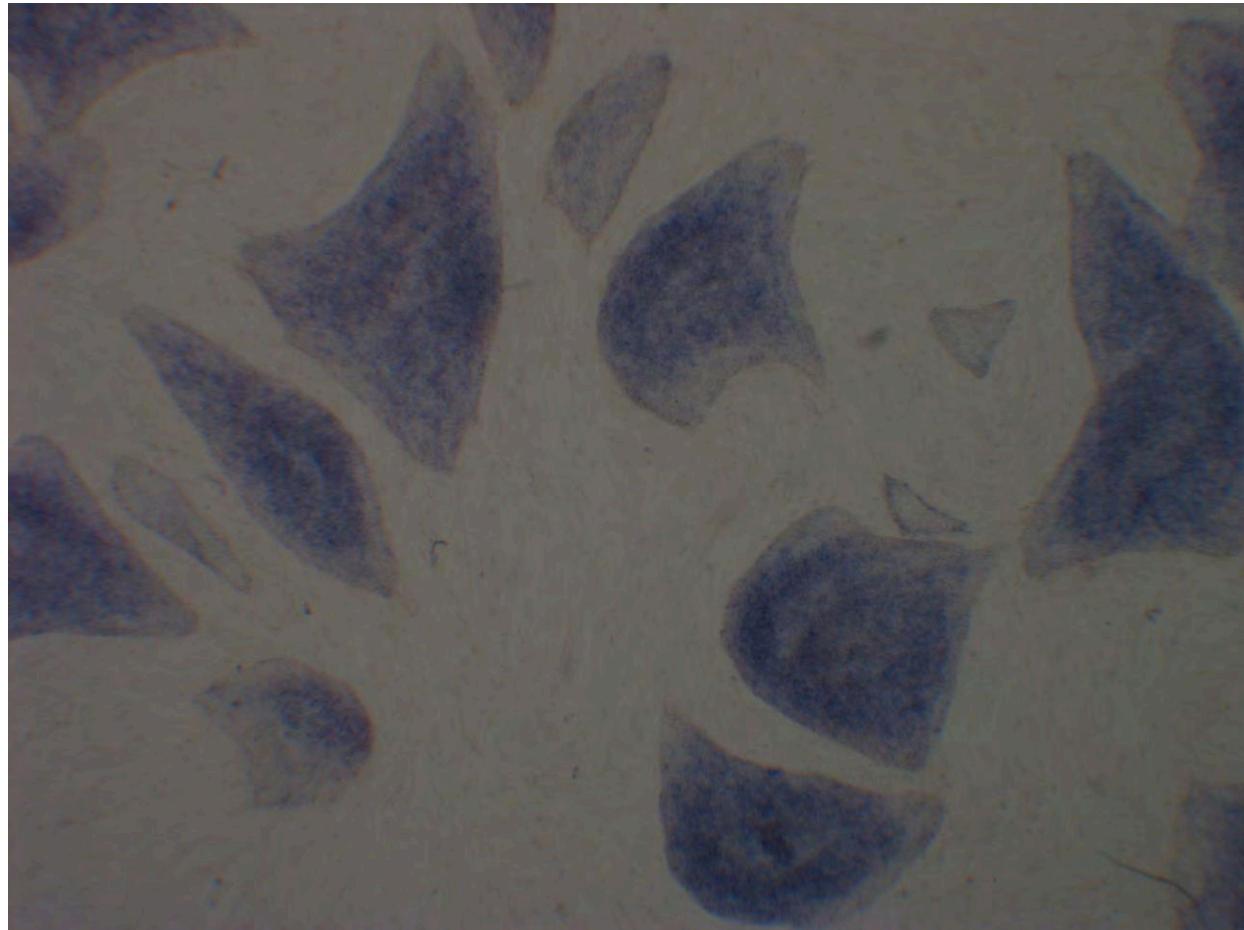
Anexo 5: Test de integración y de silenciamiento

Anexo 6: Genotipación de la línea

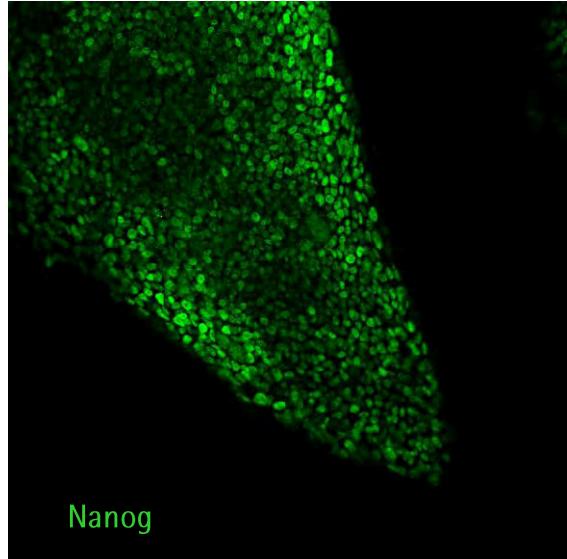
Anexo 7: Test de micoplasma

Anexo 1

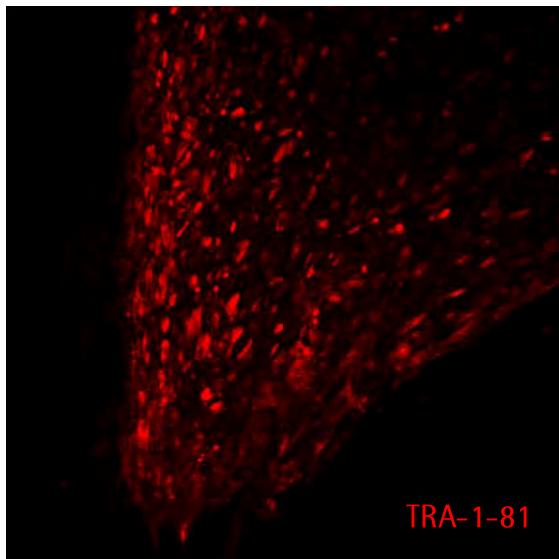
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



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

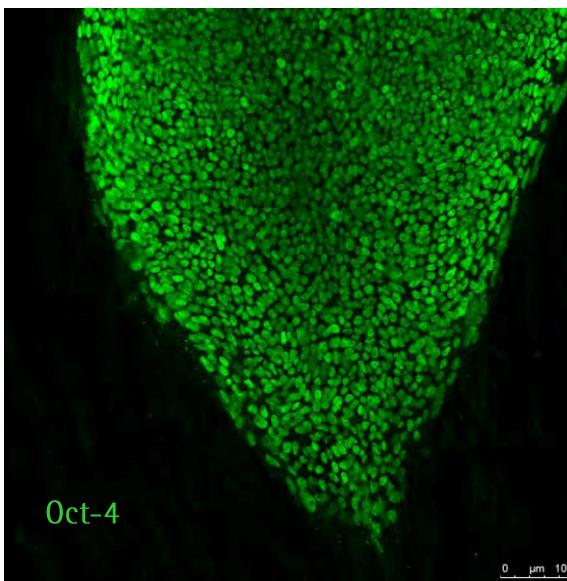


Nanog

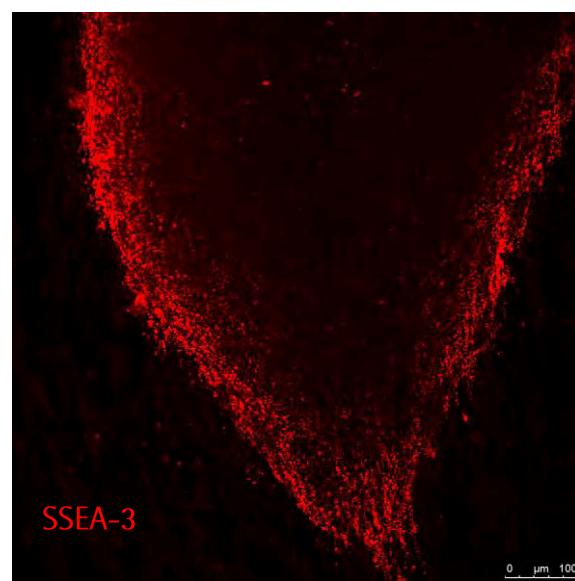


TRA-1-81

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

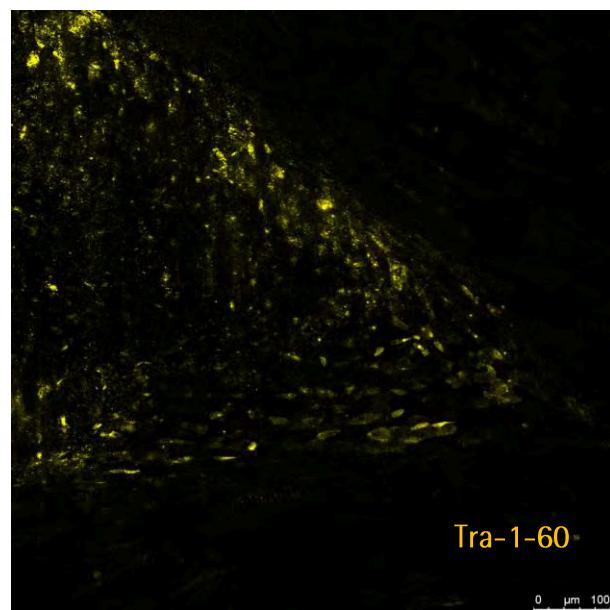
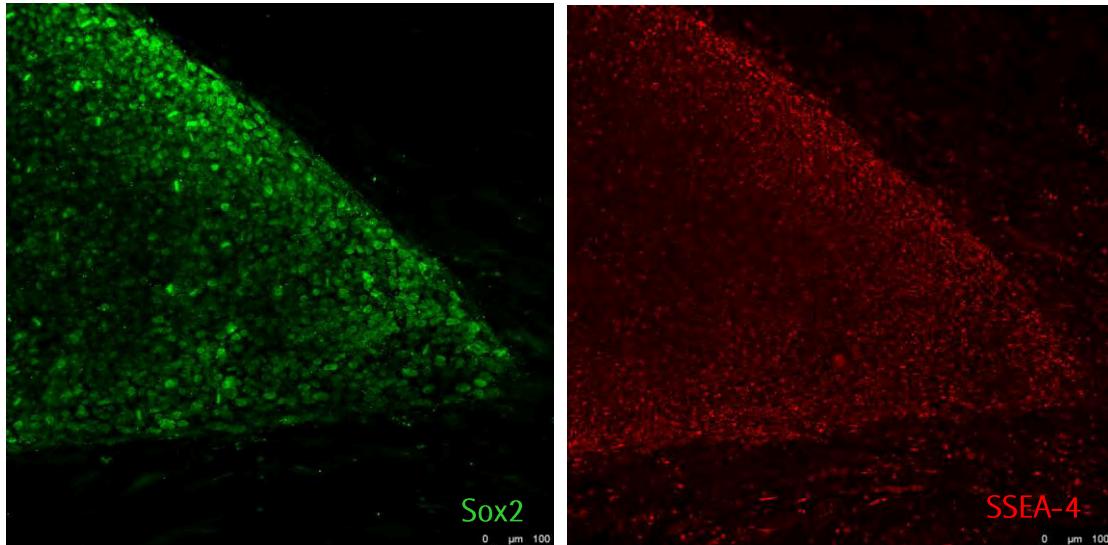


Oct-4



SSEA-3

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



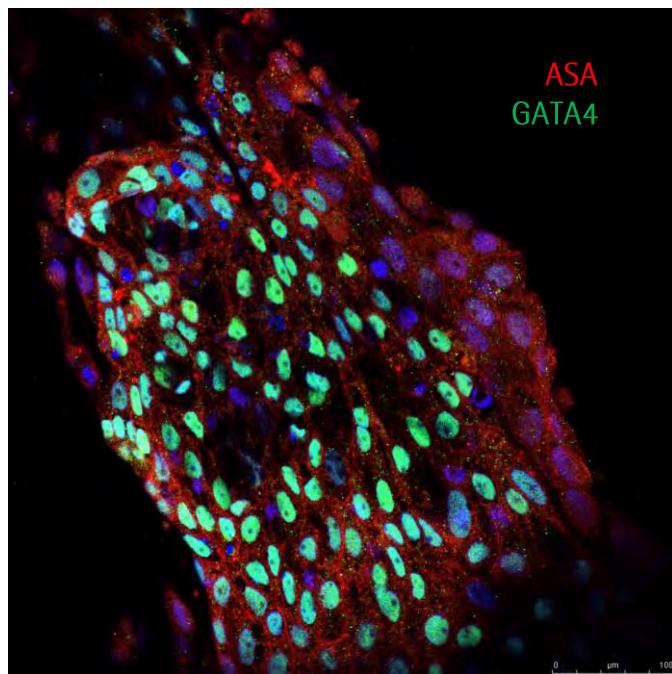
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2,SSEA-4 y TRA1-60



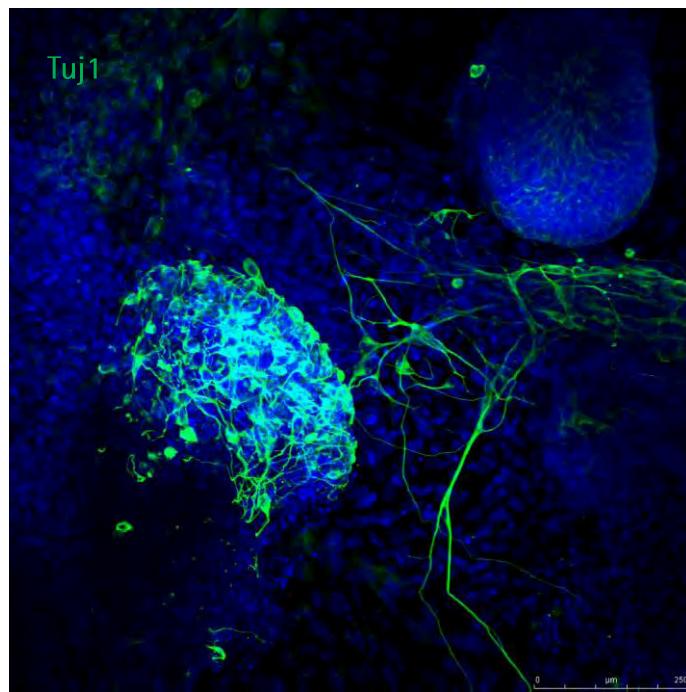
Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 2

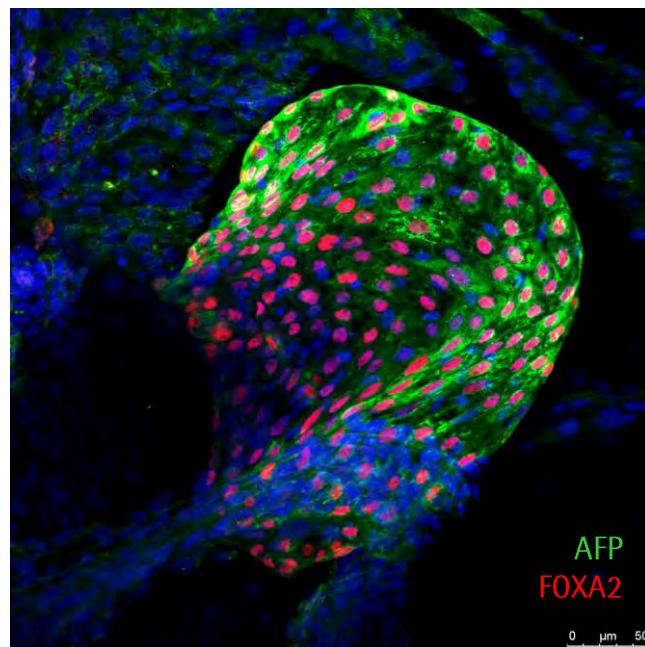
Diferenciación *in vitro*



Diferenciación *in vitro* a mesodermo: Células positivas para **ASA** y **GATA4**



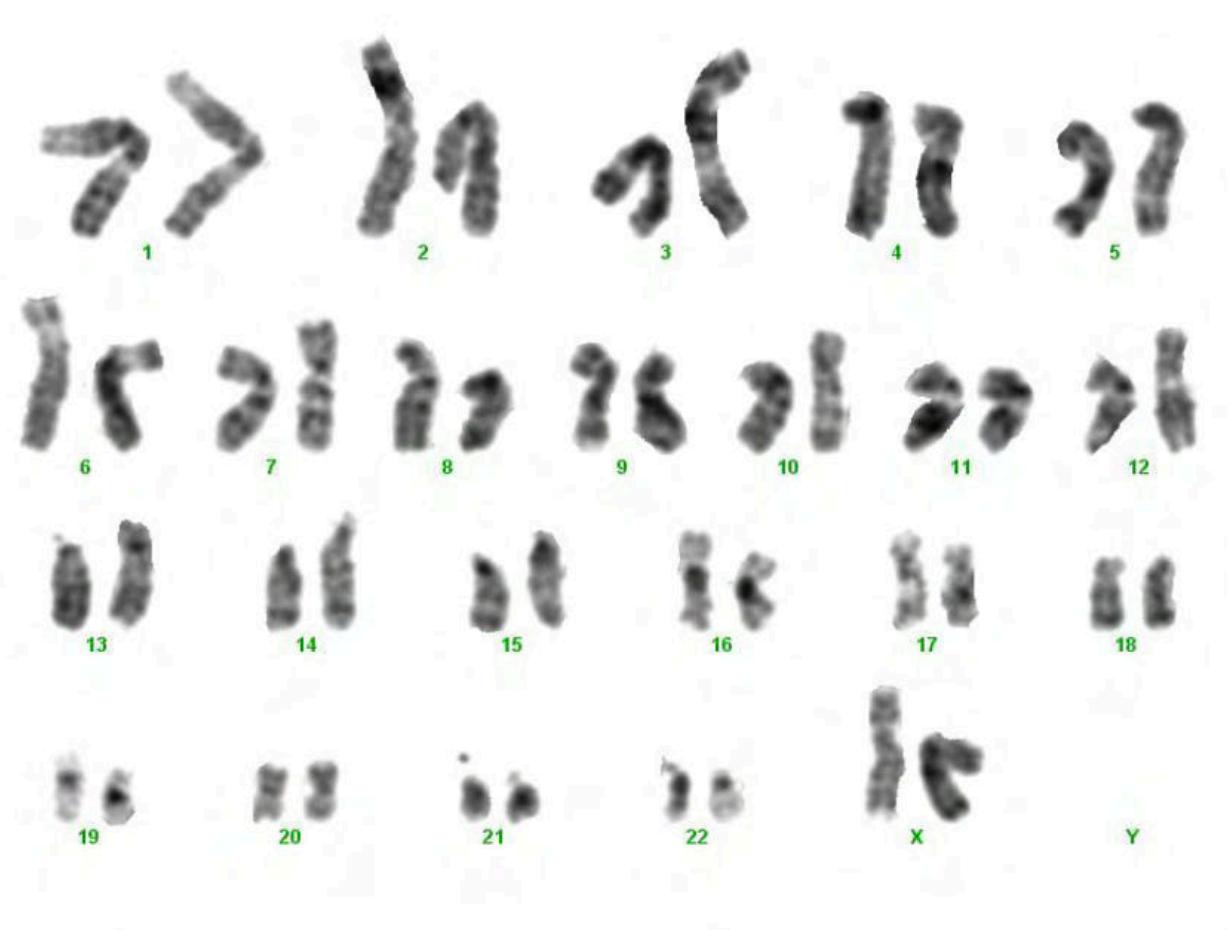
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1**



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

Anexo 3

Cariotipo





Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 4

Estudio microsatélites

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [ctrl.PD]FiPS005-4F-9 y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.



qCell Identity Test

Web: <http://www.qgenomics.com>
Email: info@qgenomics.com
Tel: 93.316.08.08

Servicio de autentificación de líneas celulares

Detalles de la solicitud

Solicitante: Cristina Gómez Santos
Centro: Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Departamento:

Detalles de la muestra

Identificador externo: PD005 CTROL FiPS-4F-9
Identificador interno: qG15013239
Descripción: 1 tubo de 15mL, con pellet celular
Nota: ID petición PD005 CTROL FiPS-4F-9, pero en el tubo indica CTRL PDFiPS 4F-9

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

Muestra	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
PD005 CTROL FiPS-4F-9	6-8	31.2-33.2	13-13	12-13	10-14	9-13	10-12	XX	16-18	8-8

Coincidencia con línea celular conocida: No Cual:

Contaminación con otra línea celular humana: No detectable

Observaciones: El patrón de marcadores STR coincide en un 100 % con la línea celular Parkinson PAL125 005 p7 (qG15013232)

Firmado:
Manel Garcia

Fecha: 02/06/2015

Breve descripción del método

El estudio se ha realizado mediante el genotipado de marcadores STR (también conocidos como microsatélites: TH01, D21S11, D5S828, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA y TPOX). La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de 1 en 2.9×10^9 . Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL).

Servicio de autentificación de líneas celulares

Detalles de la solicitud

Solicitante: Cristina Gómez Santos
Centro: Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Departamento:

Detalles de la muestra

Identificador externo: Parkinson PAL125 005 p7
Identificador interno: qG15013232
Descripción: 1 tubo de 1.5mL con pellet celular
Nota: ID petición Parkinson PAL125 005 p7, pero en el tubo indica Fibro PD005

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

Muestra	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
Parkinson PAL125 005 p7	6-8	31.2-33.2	13-13	12-13	10-14	9-13	10-12	XX	16-18	8-8

Coincidencia con línea celular conocida: No **Cual:**

Contaminación con otra línea celular humana: No detectable

Observaciones: El patrón de marcadores STR coincide en un 100 % con la línea celular PD005 CTROL FIPS-4F-9 (qG15013239)

Firmado:
Manel Garcia

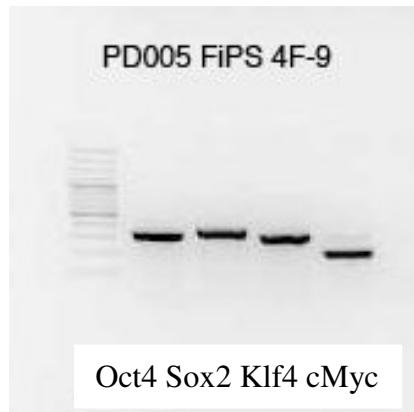
Fecha: 02/06/2015

Breve descripción del método

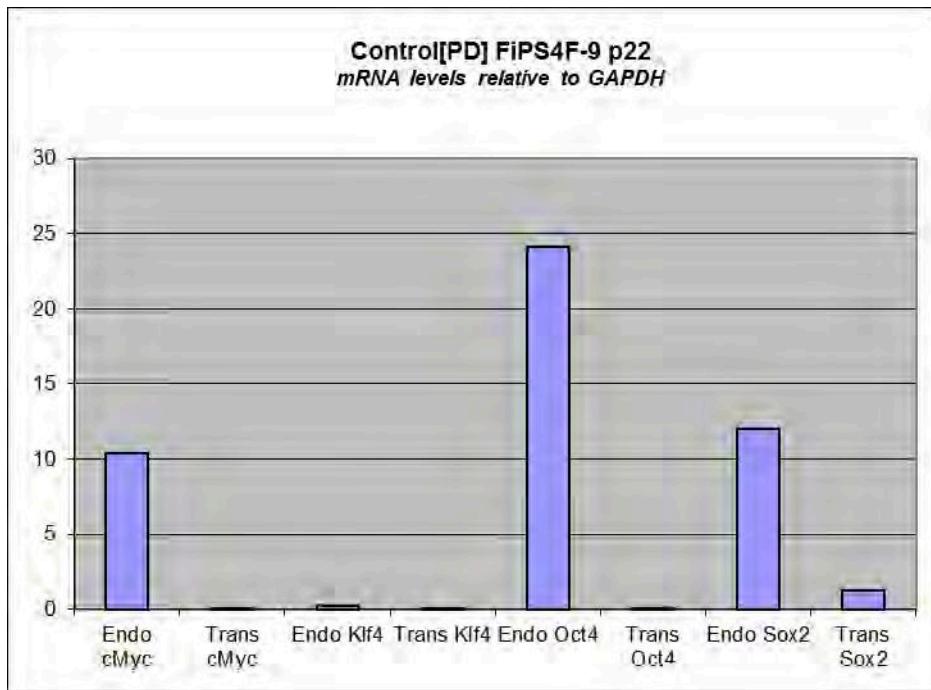
El estudio se ha realizado mediante el genotipado de marcadores STR (también conocidos como microsatélites: TH01, D21S11, D5S828, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA y TPOX). La combinación de los nueve marcadores utilizados produce un perfil de alelos con una probabilidad de coincidencia por azar de 1 en 2.9×10^9 . Se usa además un marcador para identificar el sexo de la muestra (AMEL).

Anexo 5

Estudio integración y de silenciamiento



Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los 4 genes utilizados Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-myc para generar la línea [ctrl.PD]FiPS005-4F-9



Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH.

Anexo 6

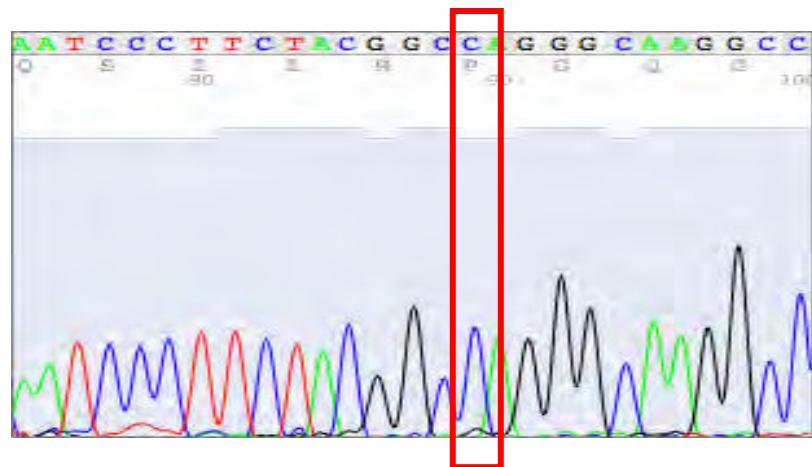
Genotipación de la línea

SAMPLE:

[ctrl.PD]005 FiPS-4F-9

Sequencing result:

GTTCTTGC~~A~~ATTGGCTCGCAGGCTGATGCCTGGCAGTGGGAGCCATGCCTATG
AAATCTC~~G~~GGCTTGTC~~A~~TCCCTCTACGGC~~C~~AGGGCAAGGCCACCTGAAAGC
CGCAGCTACCAAGAGGCTCAGTACCTGCACTGCCGAGTCAGTGCC~~T~~CCAGACGT
GAGACAGTTGGTGAGGGCACTGCTCCAGCGAGAGGCCAGCAAGA



Result:

iPS PD_005 does not present any point mutation nor deletion on exon 7

Anexo 7

Test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

