

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 a human iPS cell line

FECHA: 8/2/2017

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>	[MS] FiPS4-R4F-1
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>	Fibroblastos de dermis procedentes de biopsia de piel. Dermal fibroblasts from skin biopsy.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino; 49 años/ Female; 49 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Esclerosis múltiple <i>No Yes (specify) Multiple sclerosis</i>
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) <i>No Yes (specify)</i>

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i>	Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 16.10.2014	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 21.01.2015	
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	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/Yes 1x p2 9x p3 10x 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)</i> Specify factors and plasmids used for reprogramming	Generación de las células pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos de piel de un paciente afecto de esclerosis múltiple que presenta el genotipo CC del polimorfismo rs1800693 de TNFRSF1A, mediante la estrategia retroviral con expresión ectópica de 4 factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc). Mediante el uso de un plásmido retroviral (pMXs-OCT4- VP16- SOX2-mOrange) y un constructo tricistrónico (pMXs-KLF4-MYC-GFP) <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from skin fibroblasts of a multiple sclerosis patient, carrying CC genotype of the TNFRSF1A polymorphism rs1800693, by the retroviral strategy with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc), using tricistronic retroviral plasmids (pMXs-OCT4-VP16-SOX2-mOrange) (pMXs-KLF4-MYC-GFP).</i>	
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)	

<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>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.</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>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.</p>
<p>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. <i>Passage at the time of the banking/registration</i></p>	<p>P23</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></p> <p>Sí/ Yes <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Resultado / Result No se presenta/ Not shown</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>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Anexo 1 Annex 1	Oct 4	inmunocitoq.	16	+	
	Nanog	inmunocitoq.	16	+	
	Sox 2	inmunocitoq.	16	+	
	SSEA3	inmunocitoq.	16	+	
	SSEA4	inmunocitoq.	16	+	
	TRA-1-60	inmunocitoq.	16	+	
	TRA-1-81	inmunocitoq.	16	+	
	Fosfatasa. Alk	actividad	19	+	
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>	inmunocitoq	Tuj1 /GFAP	19	+ / +
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq.	ASMA	19	+
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocitoq.	AFP/ FOXA2	19	+ / +
Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i> <i>(spontaneous/induced)</i>	<p>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)</p> <p>Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 2)</p>				

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="708 226 807 286"> Método <i>Method</i> </th> <th data-bbox="847 226 970 286"> Marcador <i>Marker</i> </th> <th data-bbox="1002 226 1107 286"> Nº pase <i>Passage n.</i> </th> <th data-bbox="1134 226 1230 286"> Resultado <i>Results</i> </th> <th data-bbox="1283 226 1490 286"> Comentarios <i>Comments</i> </th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="584 315 724 376"> Ectodermo <i>Ectoderm</i> </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="584 409 735 470"> Mesodermo <i>Mesoderm</i> </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="584 504 735 564"> Endodermo <i>Endoderm</i> </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></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, XX; p15,p23 (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>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 4)</p>																				
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	<p>La PCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (Anexo 5)</p> <p>Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc was shown by PCR (Annex 5)</p>																				

<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>Se evidenció el silenciamiento de los 4 genes de reprogramación: Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc mediante qRT-PCR (Anexo 5)</p> <p>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown by qRT-PCR (Annex 5)</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 iPSC generada presenta el genotipo CC en el polimorfismo rs1800693 de TNFRSF1A que confiere un mayor factor de riesgo para EM y puede actuar como modificador de la enfermedad (Anexo 6)</p> <p><i>The iPSC line shows the CC genotype of the TNFRSF1A polymorphism rs1800693, which confers an increased risk factor for MS and may act as a disease modifier (Annex 6)</i></p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Negativo por PCR (Anexo 7)</p> <p>Negative by PCR (Annex 7)</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Xavier Montalbán Gairín</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Pg. Vall d'Hebron, 119-129 Edifici Cem-Cat 08035 Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR)</p>	<p>Teléfono (phone): 932746202</p> <p>Fax: 93 274 60 84</p> <p>E-mail: xavier.montalban@cem-cat.org</p>

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Ángel Raya Chamorro</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> CMRB Doctor Aiguader 88 08003 Barcelona</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB)</p>	<p>Teléfono (phone): 933160360</p> <p>Fax: 933160301</p> <p>E-mail: araya@cmrb.eu</p>

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.

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i>  Fecha/Date: 8/3/2017	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha/Date: 8/3/2017
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Joan Xavier Comella Carnicè, Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Fundació Hospital Universitari Vall d'Hebron- Institut de Recerca Edificio Mediterrània, Passeig de la Vall d'Hebron, 119-129 08035 Barcelona	Teléfono /Telephone: 934894189 Fax: 934894101 E-mail: director@vhir.org

Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) <i>(Legal Representative of the Department/Centre)</i>  Fecha/Date: 8/3/2017  <small>Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona Centre of Regenerative Medicine of Barcelona Centre of Regenerative Medicine of Barcelona</small> Aiguader, 88 08003 BARCELONA N.I.C.-63387222	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>  Fecha/Date: 8/3/2017
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Ángel Raya Chamorro, Director	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7ª planta, 08003, Barcelona	Teléfono /Telephone: 933160303 Fax: 933160301 E-mail: gerencia@cmrb.eu

ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR [MS] FiPS4-R4F-1 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

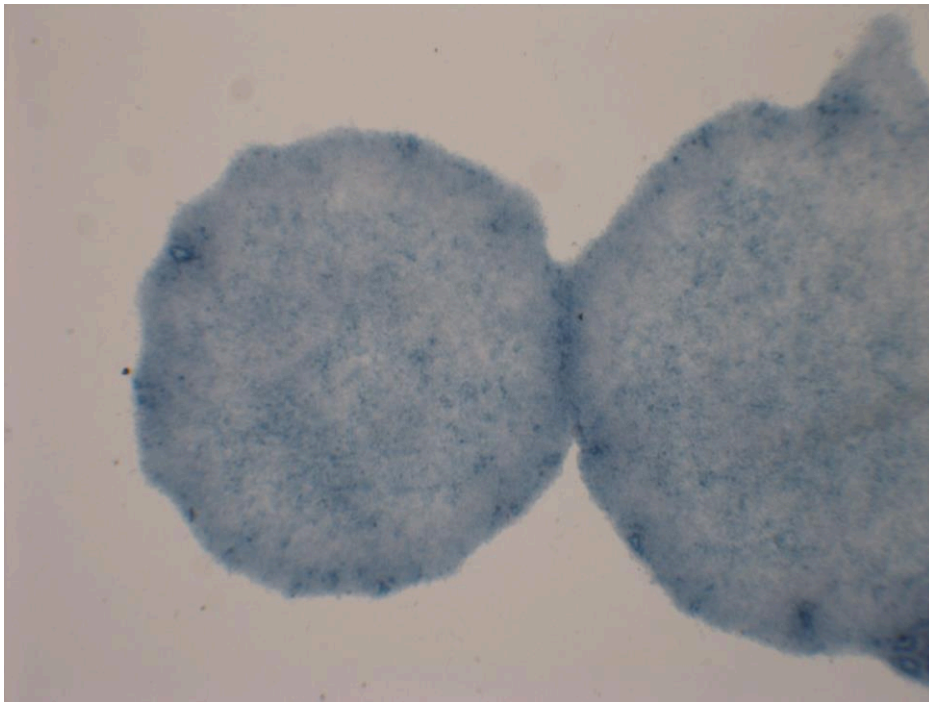
Anexo 5: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 6: Genotipado

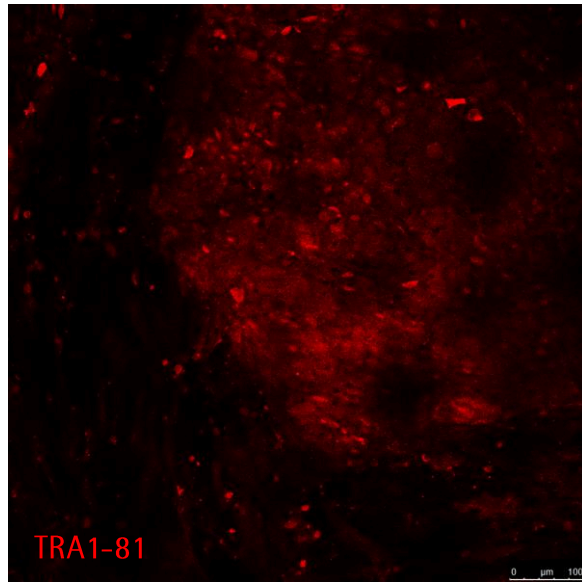
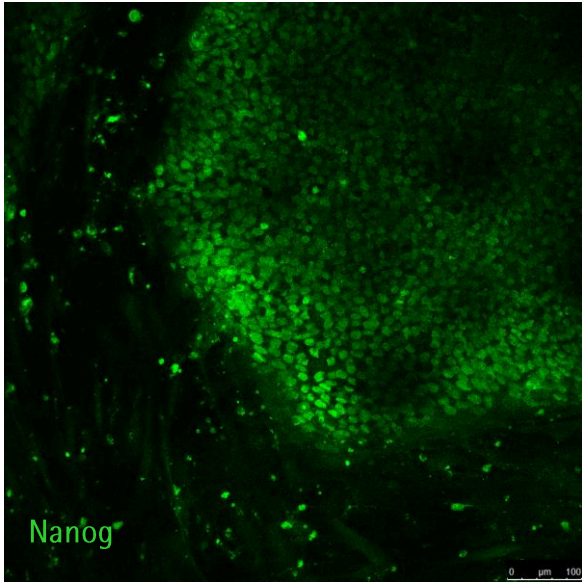
Anexo 7: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

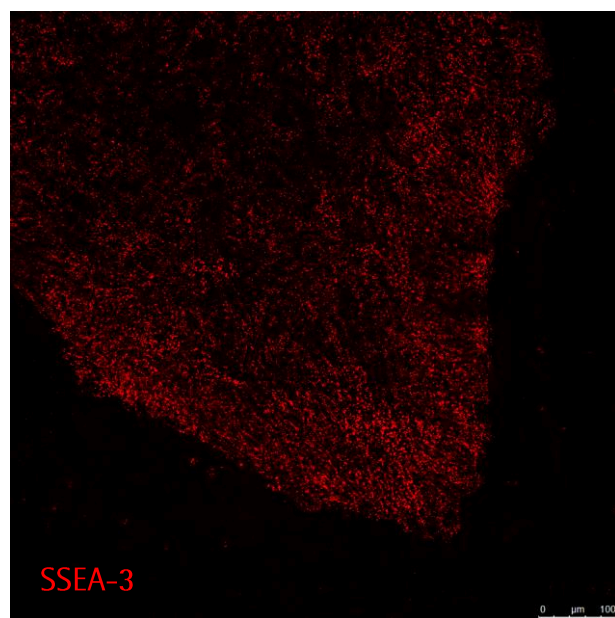
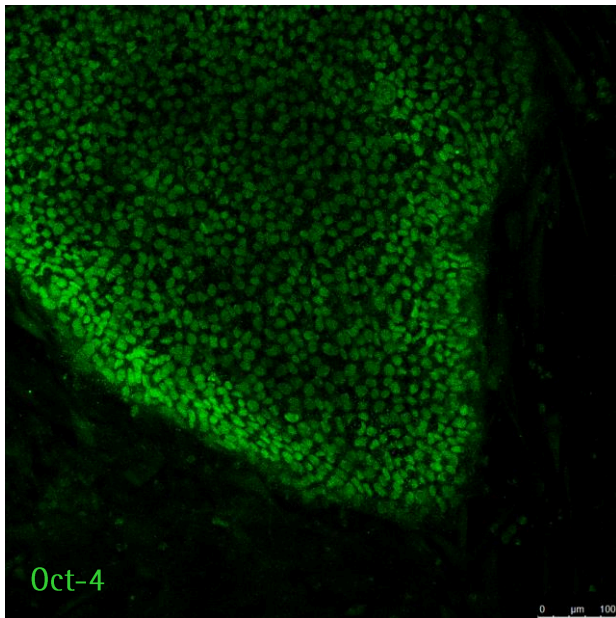


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



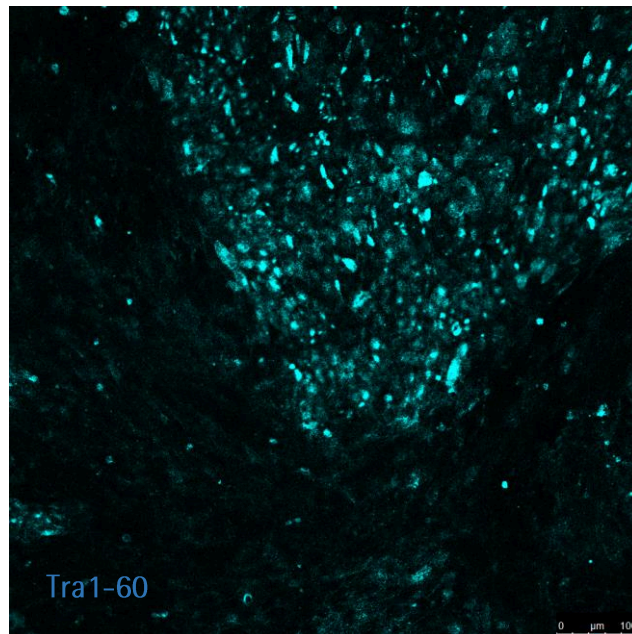
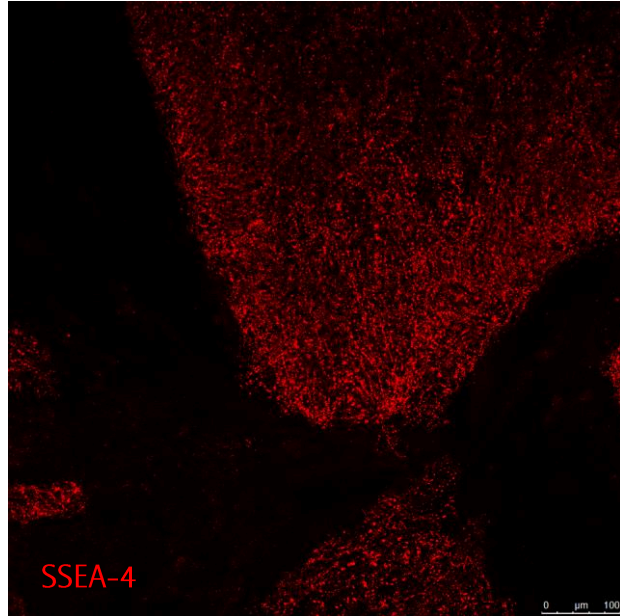
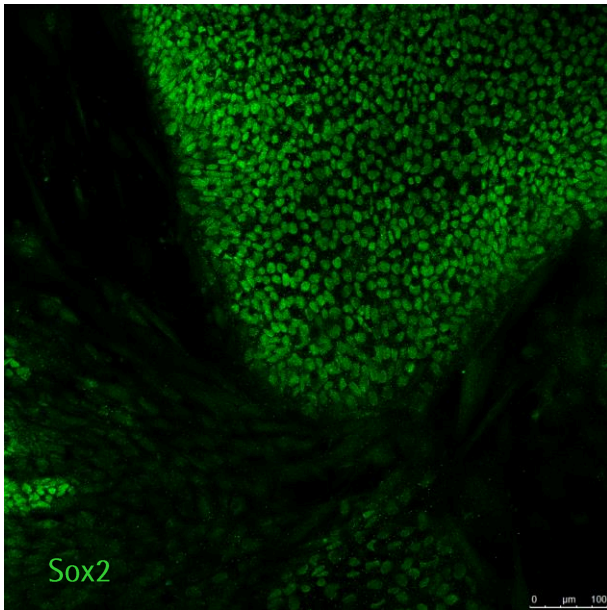
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3

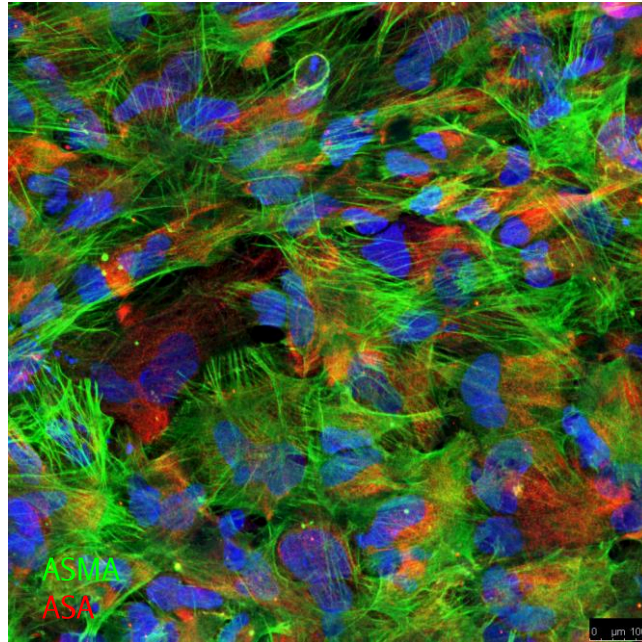


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

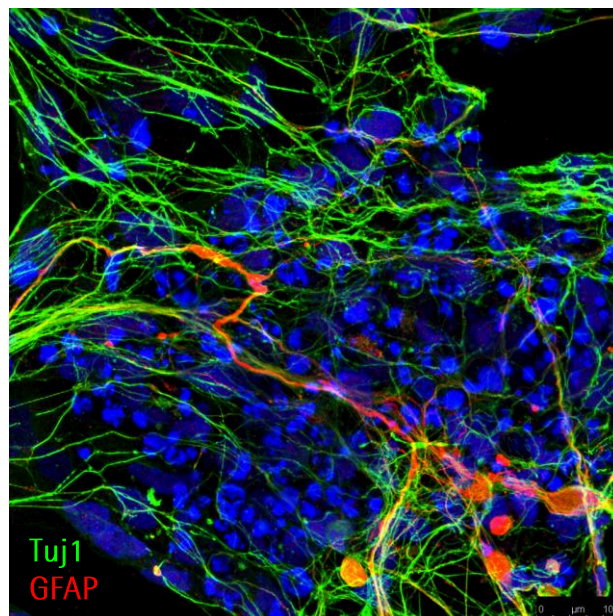
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

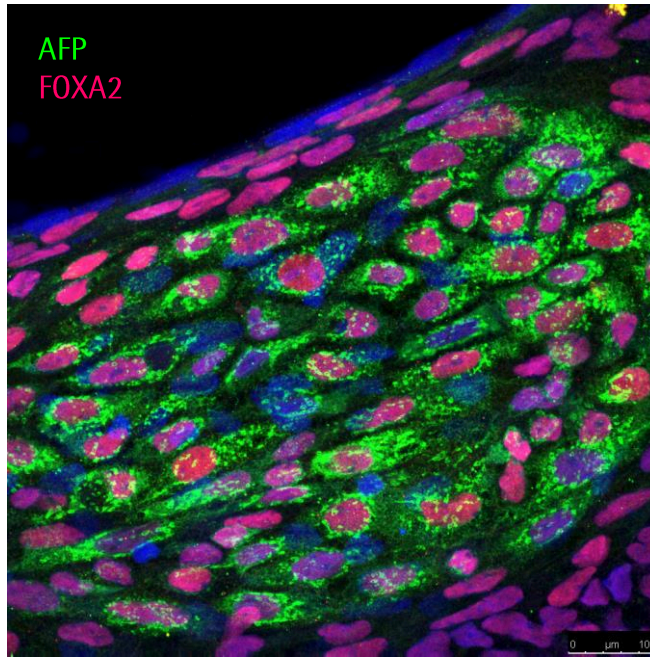
Diferenciación *in vitro*



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**



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

Anexo 3

Cariotipo

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.csl.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
32151906051	MS FIPS 4-R4F-1 p17

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
MS FIPS 4-R4F-1 p17	X	11, 13	8, 12	10, 12	28	10, 12	11, 12	6, 7	8, 11	17, 18

Granada, a 11 de Diciembre de 2015

Área de Biología Molecular

RESULTADOS:

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

código Biobanco	Línea celular
32151906042	EM4F-MDSC p4

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
EM4F-MDSC p4	X	11, 13	8, 12	10, 12	28	10, 12	11, 12	6, 7	8, 11	17, 18

Granada, a 11 de Diciembre de 2015



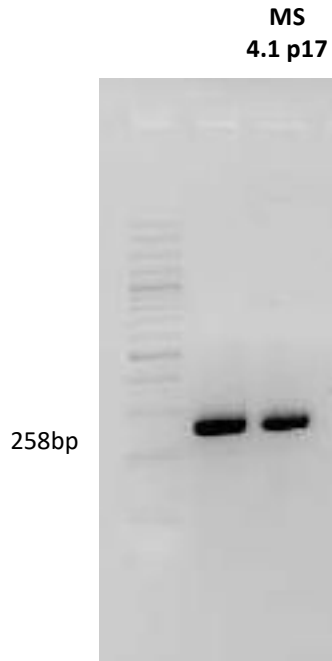
Área de Biología Molecular

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes **[MS] FiPS4-R4F-1** y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

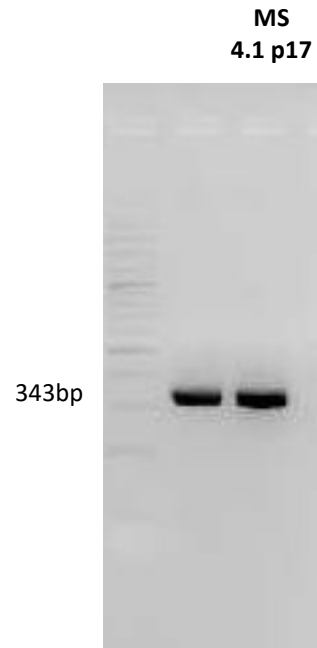
Anexo 5

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

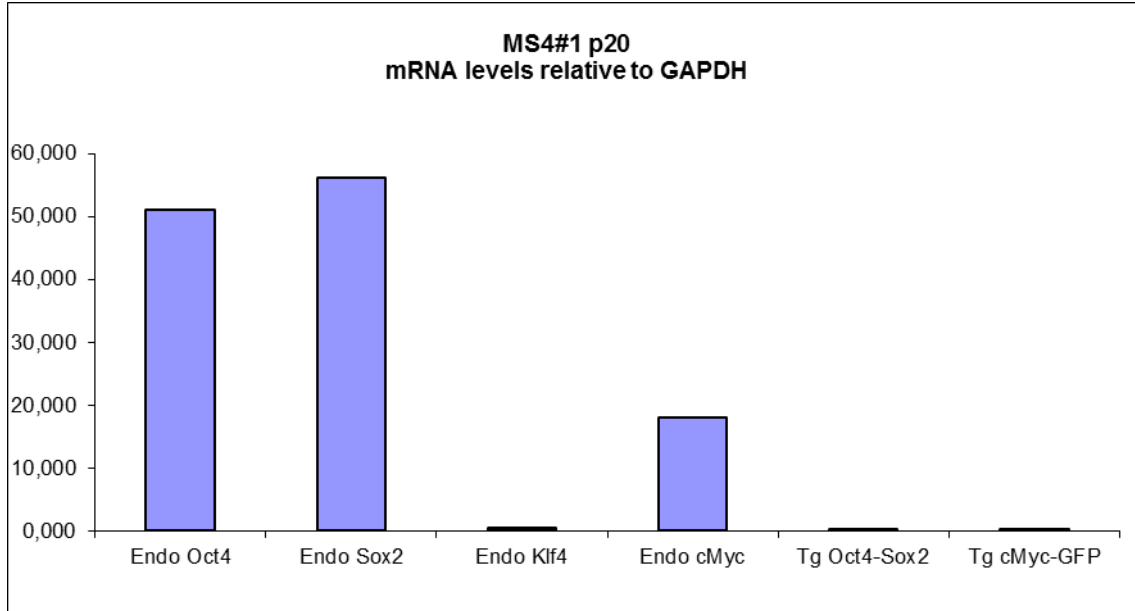
pMXs-(fl-mOct4_Vp16_PTV_HA-mSox2_mOrange



pMXs-Klf4-cMyc-GFP



Análisis gPCR mostrando las integraciones genómicas de los genes Oct-4, Sox-2, Klf4 y c-Myc utilizados para generar la línea

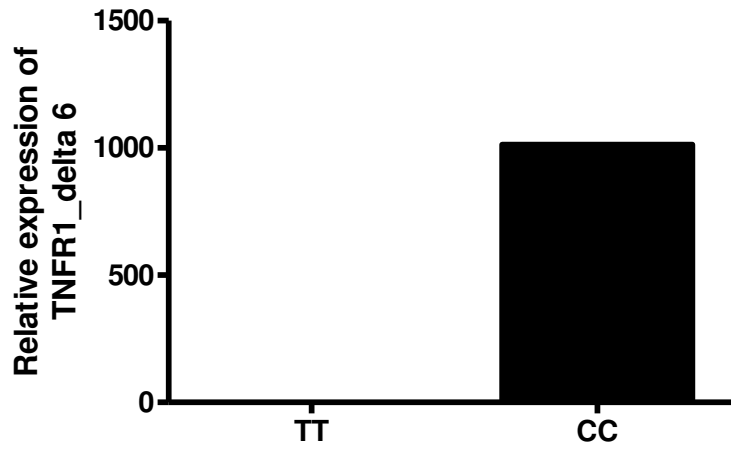


Silenciamiento de los transgenes de reprogramación. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



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

Anexo 6 Genotipado



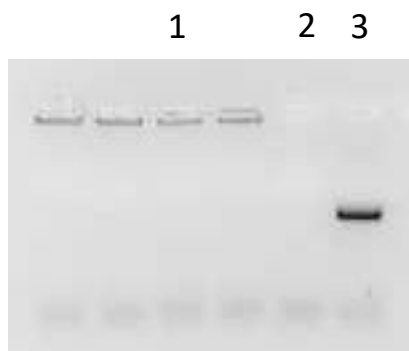
La línea **MS FiPS4-R4F-1** presenta el genotipo CC en el polimorfismo rs1800693 de TNFRSF1A, comparado con 3 controles de genotipo TT.

Anexo 7

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

10-02-2016



1. MS FiPS4-R4F-1 p22

2. CT -

3. CT +