

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: 10/3/2017

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>	[SWB]FiPS1-R4F-5
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 de dermis procedentes de biopsia de piel. <i>Dermal fibroblasts from skin biopsy.</i>
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Femenino/Female 15 años/ 15 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> No SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Yes Williams-Beuren's syndrome (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> No SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Yes 7q.11.23 deletion (specify)

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> 11.02.2013	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 2.2013	
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	
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 iPS generada (Anexo 5) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 5)</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>	Si, 10 viales en p2 Yes, 10 vials at p2	
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 los fibroblastos de un paciente que presenta la deletion 7q.11.23 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 (pMXsKLF4 MYCGFP) <i>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts of a patient showing 7q.11.23, by the retroviral strategy with ectopic expression of 4 transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc), using the retroviral plasmid (pMXs OCT4 VP16 SOX2-mOrange) and a tricistronic constructor (pMXsKLF4 MYCGFP).</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, CCL1112Sk). 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 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.</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 a 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>p59-60</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>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 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 Pluripotency test	Método Method	Nº pase Passage n.	Resultado Results	Comentarios Comments
Anexo 1 <i>Annex 1</i>	Oct 4 inmunocitoq.	6	+	
	Nanog inmunocitoq.	6	+	
	Sox 2 inmunocitoq.	6	+	
	SSEA3 inmunocitoq.	6	+	
	SSEA4 inmunocitoq.	6	+	
	TRA-1-60 inmunocitoq.	6	+	
	TRA-1-81 inmunocitoq.	6	+	
	Fosfatasa. Alk actividad	6	+	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método Method	Marcador Marker	Nº pase Passage n	Resultado Results
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocitoq. Tuj1/GFAP		+ / +
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq. ASMA		+
	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 (ver Anexo 2). Mesoderm: Embryoid bodies (EBs) cultured in culture medium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: EBs culture. Ectoderm: EBs culture in N2/B27 (see Annex 2).			

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo 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	61	+ / +	
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocitoq. ASMA	61	+	
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocitoq. AFP/ FOXA2	61	+ / +	
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	Inyección intratesticular en ratones SCID de 4•10 mill de células indiferenciadas y tras 8 semanas, análisis de los teratomas producidos mediante técnicas de inmunohistoquímica para ectodermo, mesodermo y endodermo (Anexo 3). <i>4·10 mill of undifferentiated cells were injected into the testis of SCID mice. After 8 weeks, teratomas were analyzed by immunohistochemistry for ectoderm, endoderm and mesoderm (Annex 3).</i>				
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	46 XX, p61 (Anexo4) (Annex 4)				
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 5) <i>Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical than the markers of the iPS line (Annex 5)</i>				
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	La PCR evidenció la integración de los 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc. (Anexo 6) <i>Integration of the 4 genes; Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc was shown by PCR (Annex 6)</i>				

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 mediante qRT-PCR (Anexo 6) <i>Silencing of reprogramming genes Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc has been shown by qRT-PCR (Annex 6)</i>
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>	Se presenta el detalle de la delección intersticial identificada en la banda 7q11.23 que coincide con la microdelección que presenta el paciente y que se ha descrito en la literatura como causante del Síndrome de Williams-Beuren (Anexo 7). <i>Deletion in the band 7q11.23 has shown. This deletion is identical to the one present in the patient and has been described in literature as the cause of William-Beuren Syndrome (Annex 7).</i>
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo por PCR (Anexo 8) <i>Negative by PCR (Annex 8)</i>

SECCIÓN 3

Section 3

DATOS DEL DEPOSITANTE

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: 933160301 E-mail: blc@cmrb.eu

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Ivón Cuscó Martí	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Universitat Pompeu Fabra Doctor Aiguader 88 08003 Barcelona
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Universitat Pompeu Fabra	Teléfono (phone): 933160855 Fax: 933160901 E-mail: ivon.cusco@upf.edu

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)

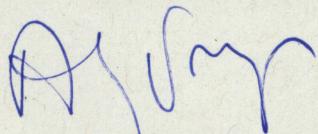
Seguimiento de la Línea (a llenar por el BNLC):

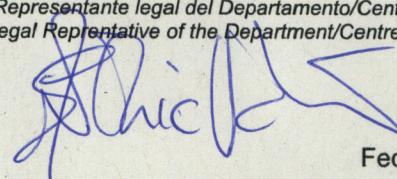
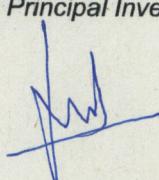
Follow up of the line (to be completed by BNLC)

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.

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre)</i></p>  <p>Fecha/Date: 19/1/2017</p> <p>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Center of Regenerative Medicine in Barcelona Dr. Aiguader, 88 08003 BARCELONA 933160303 63687222</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p>  <p>Fecha/Date: 19/1/2017</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Ángel Raya Chamorro, Director</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona Doctor Aiguader, 88, 7^a planta, 08003, Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone: 933160303</p> <p>Fax: 933160301</p> <p>E-mail: gerencia@cmrb.eu</p>

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre)</i></p>  <p>Fecha/ Date: 8/1/17</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p>  <p>Fecha /Date</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Enric Vallduví, Vicerrector de Investigación y Doctorado</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p> <p>Universitat Pompeu Fabra Departament de Ciències Experimentals i de la Salut Unitat de Genètica Doctor Aiguader 88, 08003, Barcelona</p>	<p>Teléfono /Telephone:</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail:</p>



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 [SWB]FiPS1-R4F-5 EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES

ANEXOS

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

Anexo 2: Diferenciación *in vitro*

Anexo 3: Diferenciación *in vivo*

Anexo 4: Cariotipo

Anexo 5: Resultados microsatélites

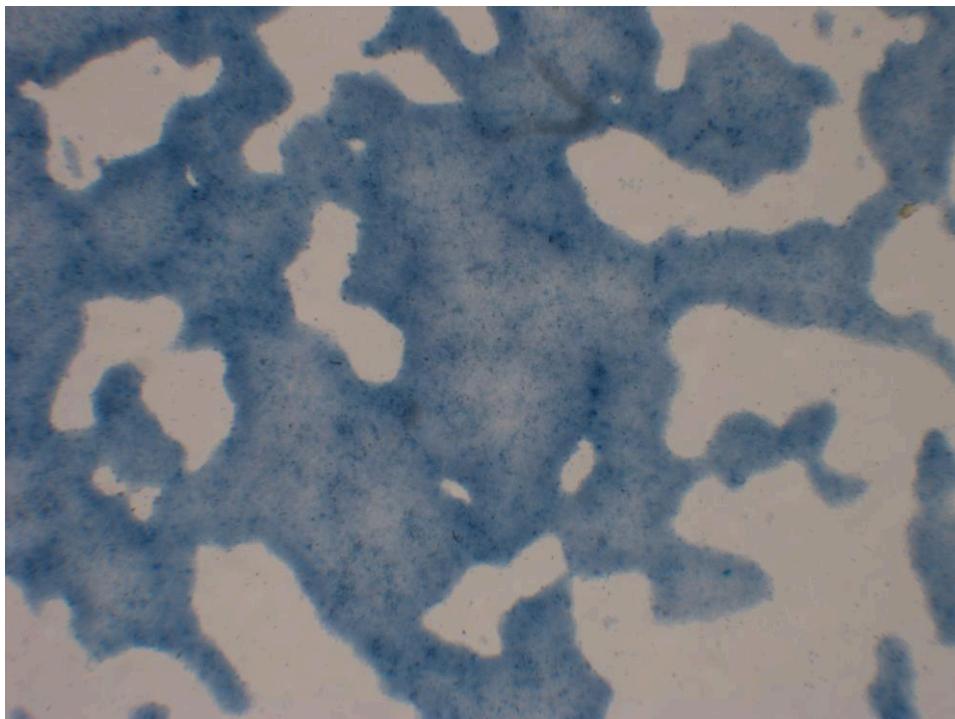
Anexo 6: Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

Anexo 7: Genotipado

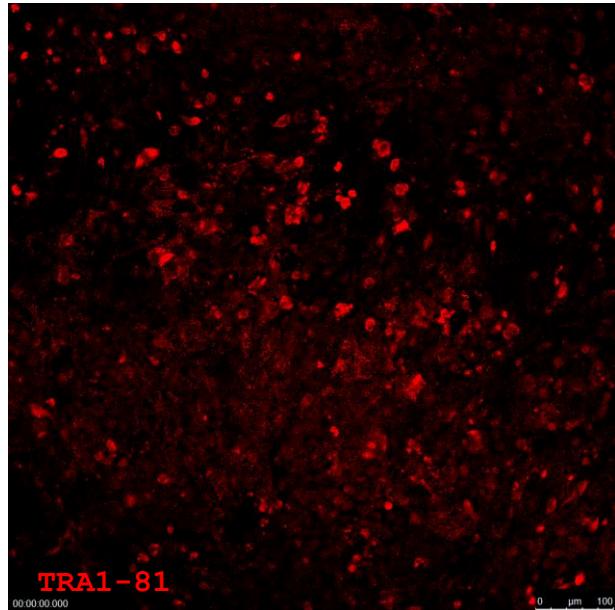
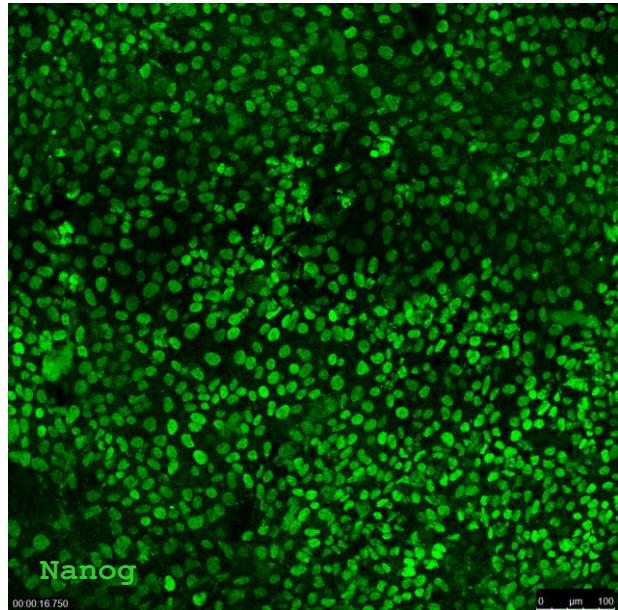
Anexo 8: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

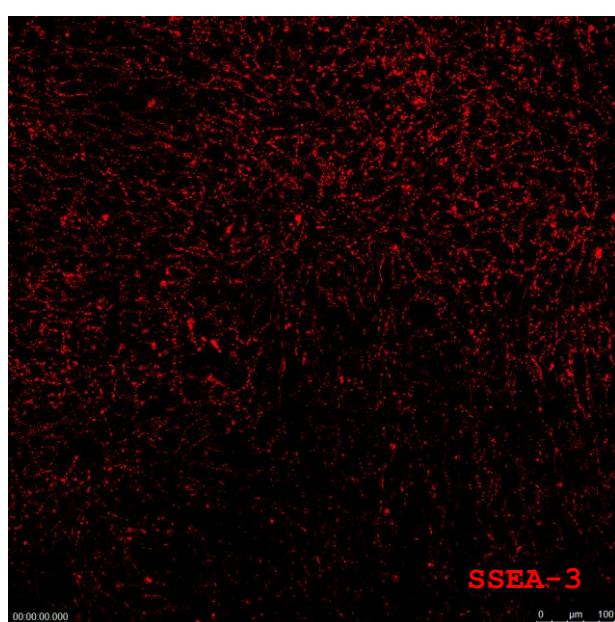
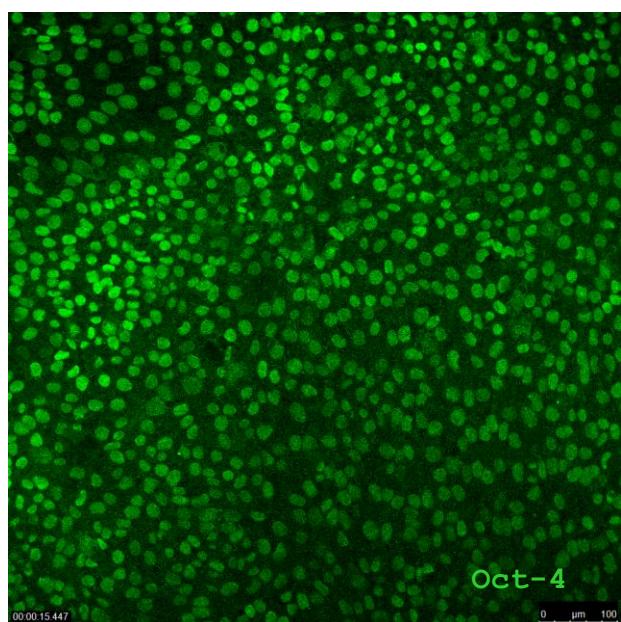


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



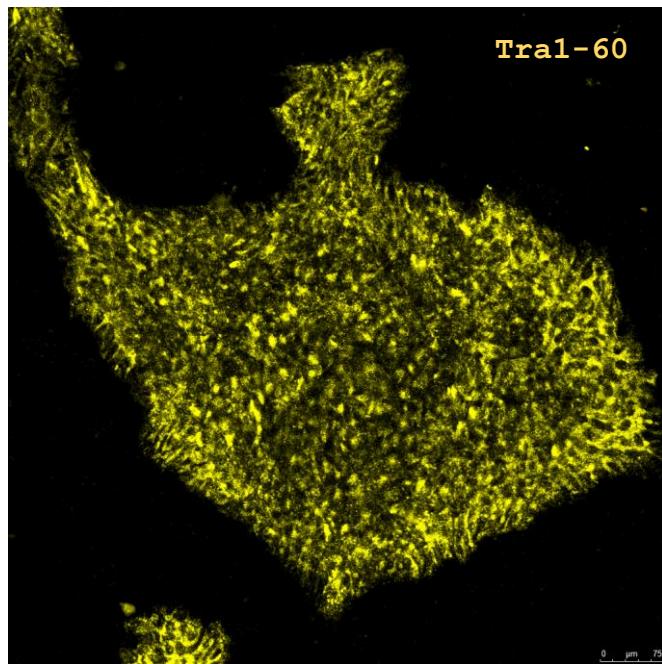
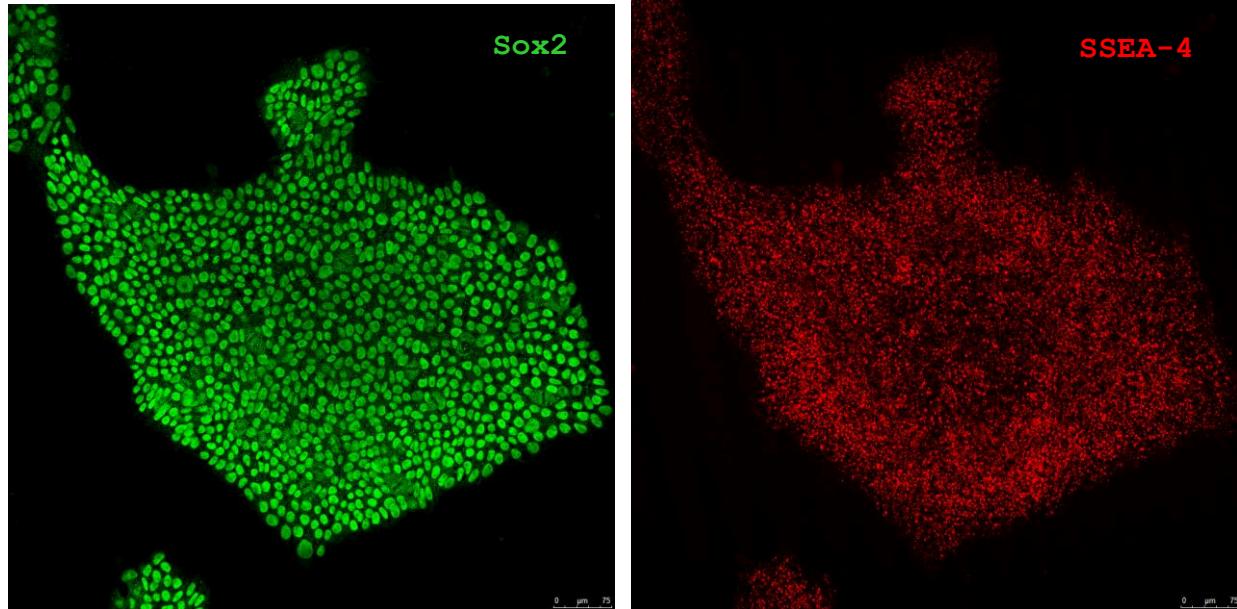
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

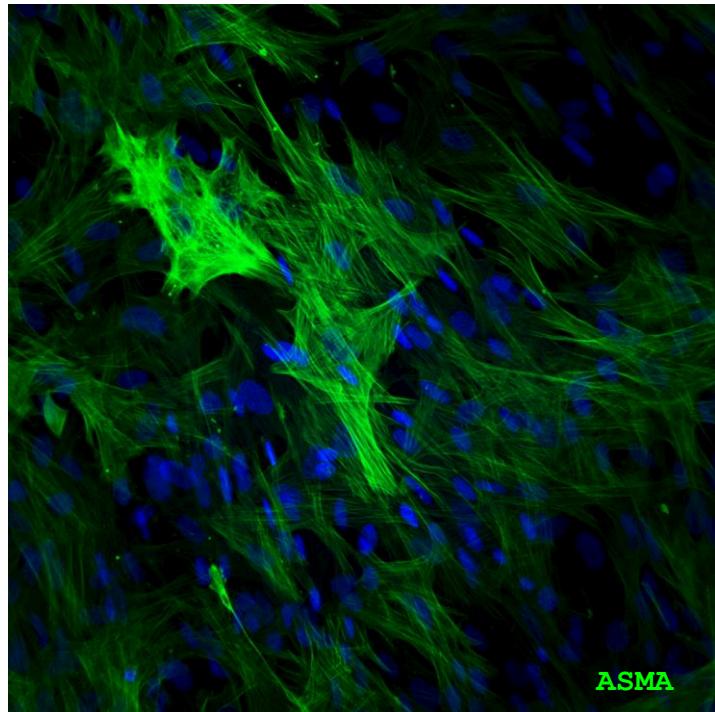
Oct-4 y SSEA-3



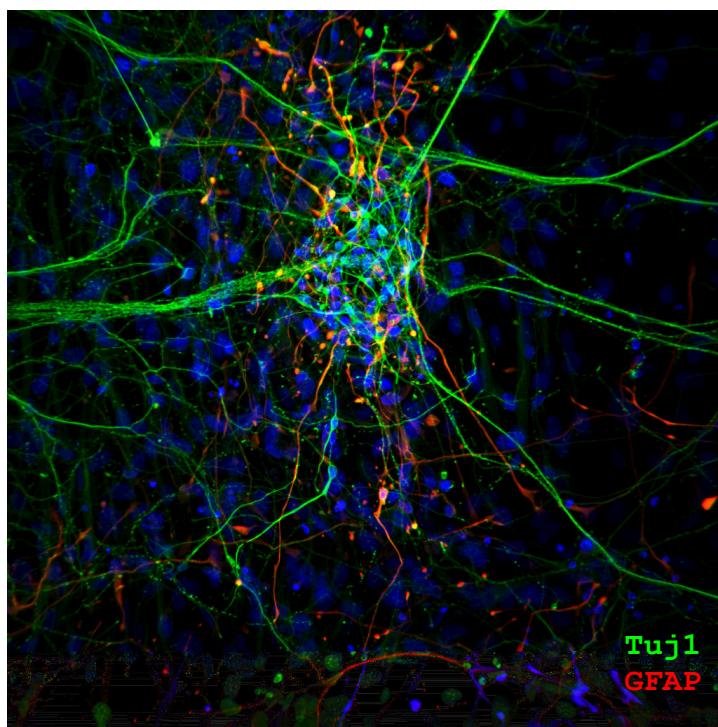
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

Anexo 2

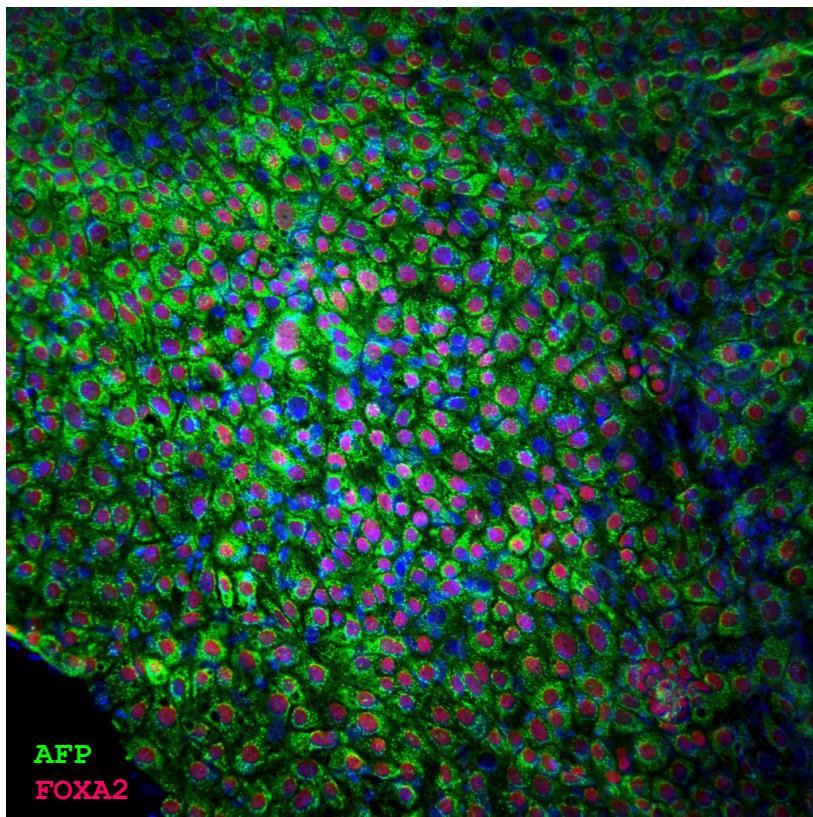
Diferenciación *in vitro*



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



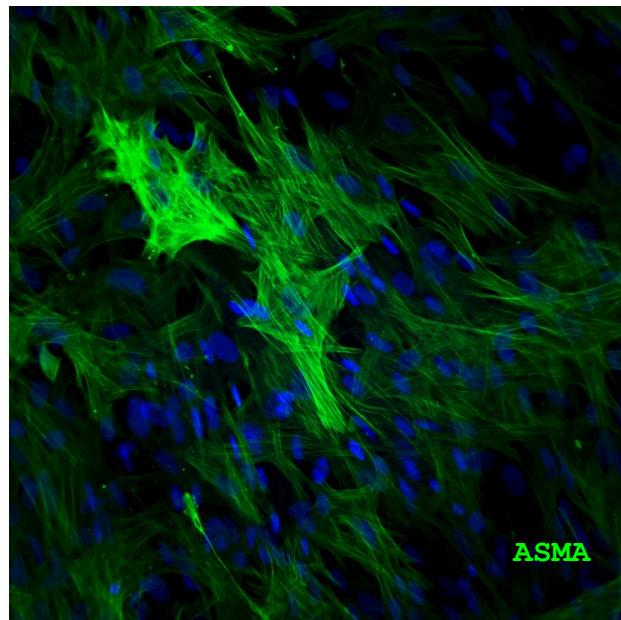
Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para **Tuj1** y **GFAP**



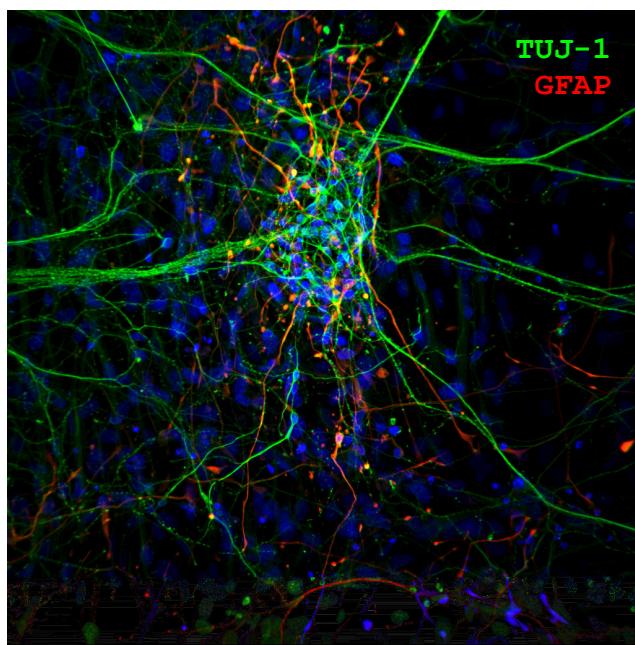
Diferenciación *in vitro* a endodermo: Células positivas para **AFP** y **FOXA2**

Anexo 3

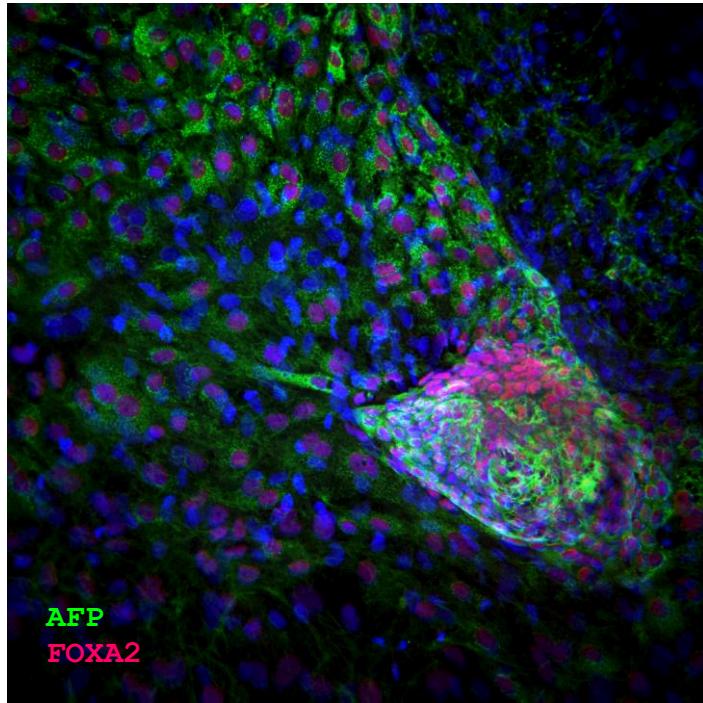
Diferenciación *in vivo*



Diferenciación *in vivo* a mesodermo: Células positivas para **ASMA**



Diferenciación *in vivo* a ectodermo: Células positivas para **TUJ1** y **GFAP**.



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

Anexo 4

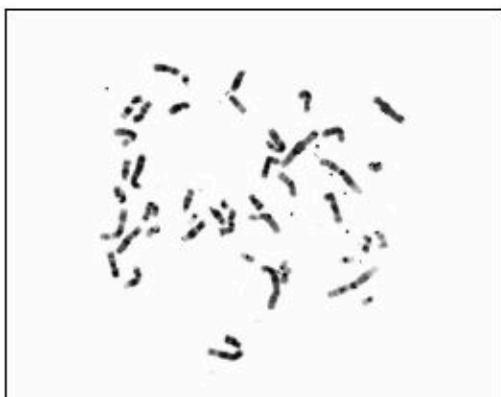
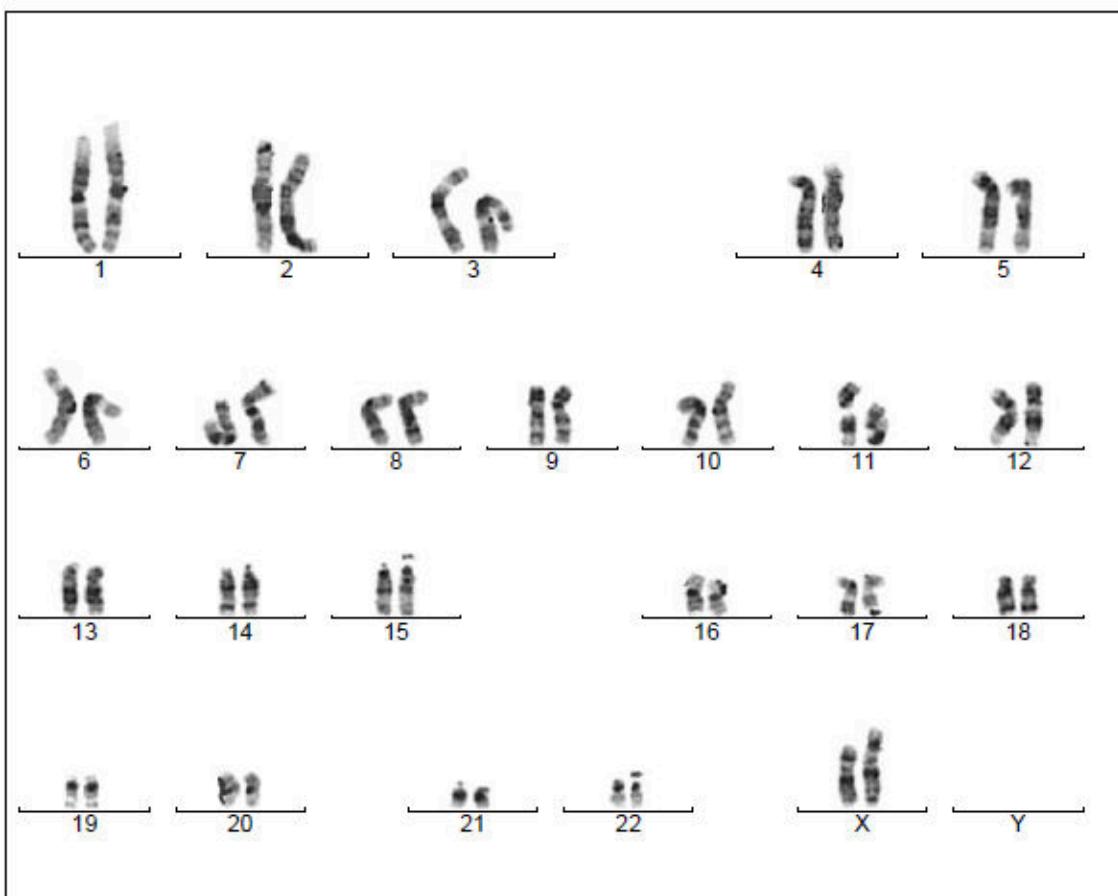
Cariotipo



Ambar

ANÀLISIS MÈDICS
BARCELONA

Cytogenetic analysis



Case name: A161164

Patient name: SWB-FiPS1-R4F-5

Specimen type: stem cells

Result: 46,XX

Anexo 5

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
32151906047	SWB FiPS1-R4F-5 p60

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

Línea celular	Locí STR analizados									
	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D21S11	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA
SWB FiPS1-R4F-5 p60	X	11	8, 12	12, 13	28, 29	11, 12	9, 13	6, 9.3	8	16, 18

Granada, a 11 de Diciembre de 2015

Área de Biología Molecular



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: Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Departamento:

Detalles de la muestra

Identificador externo: Fibros SW112-01 p3
Identificador interno: qG15013846
Descripción: 1 epp amb pellet

Informe de resultados

Resultados

Calidad de la muestra: Correcta

Muestra	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	AMEL	vWA	TPOX
Fibros SW112-01 p3	6-9.3	28-29	11-12	8-12	9-13	12-13	11-11	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 SWB FiPS4F-1-1 (qG15013845)

Firmado:
Manel Garcia

Fecha: 20/07/2015

Análisis de microsatélites en la línea de células madre pluripotentes [SWB]FiPS1-R4F-5

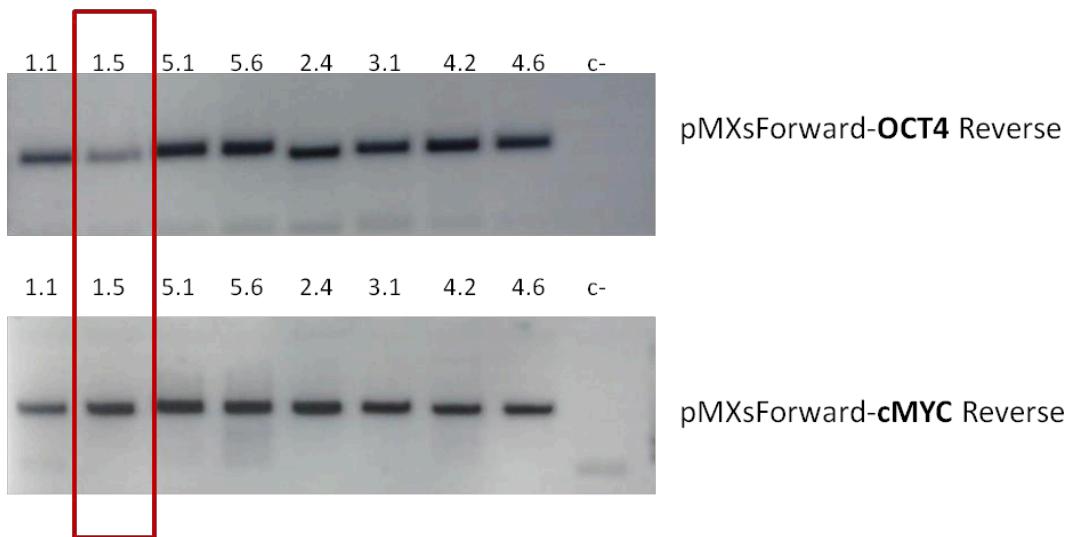
y en la línea de fibroblastos de la cual proceden.

Anexo 6

Integración y silenciamiento de los transgenes de reprogramación

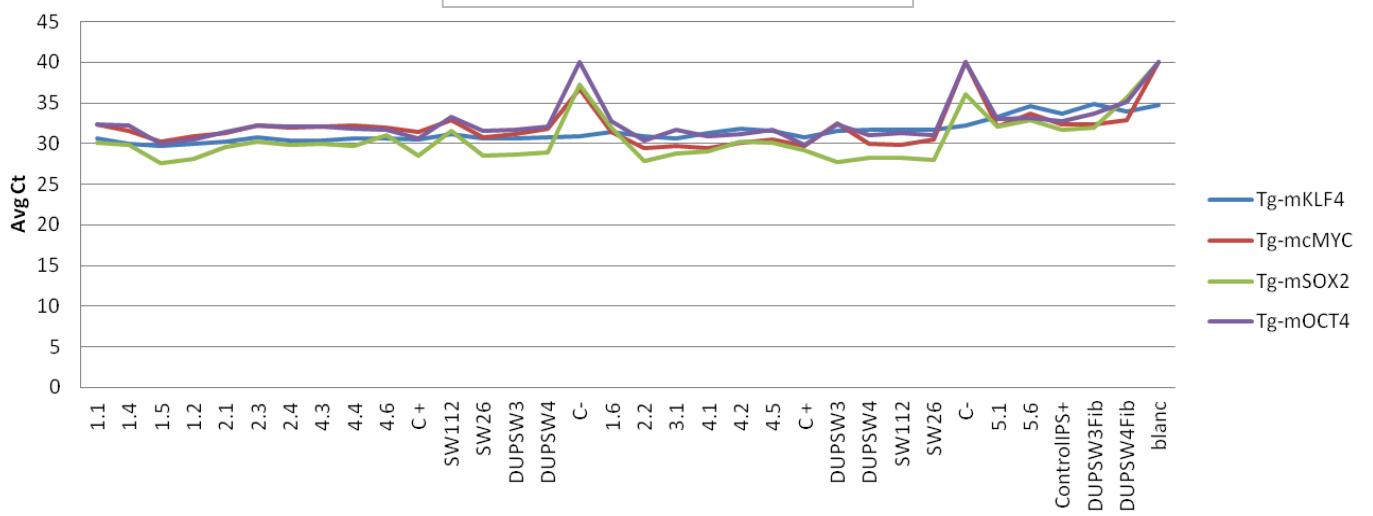
Integration Study by PCR analysis of genomic DNA

Constructs used (pMXs OCT4 VP16 SOX2-mOrange) & (pMXsKLF4 MYC-GFP)



Análisis PCR mostrando las integraciones genómicas de los genes utilizados Oct-4, Sox-2 y cMYC para generar la línea

Amplificación Tg-markers



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

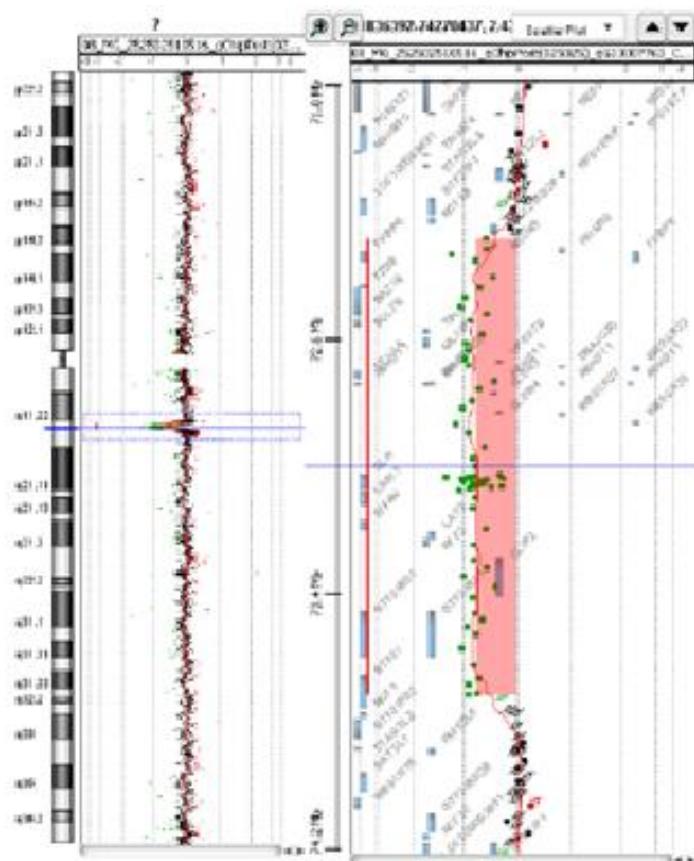


Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona
Center of Regenerative Medicine in Barcelona

Anexo 7

Genotipado

Genotyping showing the 1.5Mb deletion of 7q11.23 model by CGH array of Clone 1.5



Detalle de la delección intersticial de 1,5Mb identificada en el presente caso en la banda 7q11.23 que coincide con la microdelección recurrente de esta banda descrita en la bibliografía como causa del síndrome de Williams-Beuren.

Anexo 9

Resultado test de micoplasma

MYCOPLASMA TEST

03-11-2015



1. SWB FiPS1-R4F-5 p61
2. CT -
3. CT +