

Fecha de recepción (Date received):

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE REGISTRO Y DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPSC HUMANA

Application Form to Register and Deposit of an human iPSC cell line

FECHA: 8.02.2021

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 de Ética de la Investigación 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
- Número de registro del proyecto**

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 iPSC <i>Name of the iPSC line:</i>	BS PBiPS46-Sv4F-10
Nº de registro en el Human Pluripotent Stem Cell Registry (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>	Células mononucleadas de sangre periférica Peripheral blood mononuclear cells
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Masculino 68 años Male 68 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Brugada's Syndrome <i>No Yes (specify)</i>
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Seven genetic variants within the SCN10A gene <i>No Yes (specify)</i>

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	<p style="text-align: center;"> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i> </p>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	<p style="text-align: center;">07.05.2019</p>
Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i>	<p style="text-align: center;">07.05.2019</p>
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR/otros marcadores de las células de origen <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR/ other markers of the original cells.</i>	<p>Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial coinciden con los de la línea de iPSC generada (Anexo 4)</p> <p>Microsatellite markers of the original sample are identical to the markers of the iPSC line (Annex 4)</p>
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>	<p>Generación de las células de pluripotencia inducida (iPSC) a partir de células mononucleadas de sangre periférica de un paciente con Síndrome de Brugada con el kit de reprogramación CytoTune®-iPS 2.0 Sendai, un sistema no integrativo que utiliza vectores del virus Sendai. Este kit incluye tres vectores: policistrónico Klf4-hOct3/4-Sox2, cMyc y Klf4.</p> <p>The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from Peripheral Blood Mononuclear Cells from a Brugada's Syndrome patient, with the CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, a non-integrating system that uses Sendai virus vectors. This kit includes three vector preparations: polycistronic Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc, and Klf4.</p>
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>	<p>Support: human foreskin fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, CCD1112Sk).</p> <p>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). COMPROBAR</p> <p>Support: Matrigel (Corning BV) Culture medium: mTeSR Basal Medium Kit (StemCell Technologies)</p>
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	<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>The clumps of colonies were cryopreserved in FBS (90%)+ DMSO (10%), by programmable freezer (0.5°C/min) or in isopropanol containers at -80°C (-1°C/min). Vials were thawed quickly at 37°C.</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>Viales congelados a pases 4-12</p> <p>Frozen vials at passages 4-12</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>Especificar: <i>Specify:</i></p>
--	---

SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA iPSC.

Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

Section 2 iPSC 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>
Se informará de al menos 5 de los siguientes marcadores <i>At least 5 of the following test will be reported</i>	Oct 4	inmunocitoquímica	10	+	
	Nanog	inmunocitoquímica	10	+	
	Sox 2	inmunocitoquímica	10	+	
	SSEA3	inmunocitoquímica	10	+	
	SSEA4	inmunocitoquímica	10	+	
	TRA-1-60	inmunocitoquímica	10	+	
	TRA-1-81	inmunocitoquímica	10	+	
	Fosfatasa. Alk actividad		10	+	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Método <i>Method</i>		Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Cuerpos embrioides <i>Embryoid bodies</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocit. Tuj1/GFAP	11	+/-	
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocit. ASMA/ASA	11	+/-	
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocit. AFP/FOXA2	11	+/-	
Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	Método <i>Method</i>		Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>
Teratomas <i>Teratomas</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>				
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>				
	Endodermo <i>Endoderm</i>				

Cariotipo (pase) <i>Karyotype (passage)</i>	46, XY p14 (Anexo/Annex 3)
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR/ otros marcadores de la línea celular/ Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR/ other cell line markers	<p>Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial coinciden con los de la línea de iPSC generada (Anexo 4)</p> <p>Microsatellite markers of the original sample are identical to the markers of the iPSC line (Annex 4)</p>
Test de integración) <i>Integration Test)</i>	<p>No procede, debido a que se trata un método no-integrativo</p> <p>Not applicable, due to non-integrating reprogramming methodology</p>
Test de silenciamiento) <i>Silencing Test)</i>	<p>El análisis mediante RT-PCR mostró la ausencia de mRNA derivado de virus Sendai en la línea de iPSC y la presencia de mRNA derivado de virus Sendai en células control tras 1 semana de transducción (Anexo 5).</p> <p>The RT-PCR showed absence of Sendai virus derived mRNAs in iPSCs and presence of Sendai virus derived mRNAs in virus transduced control cells 1 week after transduction (Annex 5).</p>
Confirmación de la presencia de la mutación de las células de origen <i>Confirmation of the mutation in the original cells</i>	<p>En el anexo 6 se presenta los resultados de la secuenciación en células del paciente de Brugada y la comprobación de las mismas en la iPSC generada</p> <p>Annex 6 shows the sequencing results i the patient cells and the verification in the generated iPSC.</p>
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	<p>Negativo por PCR (Anexo 7)</p> <p>Negative by PCR (Annex 7)</p>

SECCIÓN 3
Section 3

DATOS DEL DEPOSITANTE
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Ramon Brugada Terradellas	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Parc Hospitalari Martí i Julià. 17190 Salt (Girona)
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centre de Genètica Cardiovascular Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta	Teléfono (phone): +34 872987087 Fax: E-mail: rbrugada@idibgi.org

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)

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 <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i>	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>
Fecha/ Date:	Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Anna Ribas Gubau. Gerente. Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Edifici M2, Parc Hospitalari Martí i Julià 17190 Salt (Girona)	Teléfono /Telephone: +34 872.98.70.87 (Ext. 20) Fax: E-mail: aribas@idibgi.org

Firma del responsable de la generación de las iPSC/Centro de generación <i>Signature of the responsible for the iPSC generation/ Generation center</i>	
Fecha/ Date:	
Nombre y Cargo del responsable de la generación: <i>Name and Position of the responsible for the iPSC generation</i> Anna Veiga Lluch. Directora del Banco de Líneas Celulares. Programa de Medicina Regenerativa. IDIBELL.	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Hospital Duran i Reynals. Gran Via de l'Hospitalet 199. 08908. Hospitalet de Llobregat. Barcelona	Teléfono /Telephone: 93 3160360 Fax: E-mail: aveiga@idibell.cat

(1) Instrucciones para la realización del registro de líneas hESC y hiPSC generadas en España en el Human Pluripotent Stem Cell Registry

Entre en la página web: <https://hpscereg.eu/>

Cree su perfil rellenando el formulario on-line Sign up form. Después de hacer click en Sign up, recibirá el mensaje de confirmación de los datos y se le enviará el correo electrónico de confirmación.

Registro de líneas:

- Register Cell Line> Create a standard cell line name> Generator Institution: Assign an existing institution:
Introducir: Spanish Stem Cell Bank
- hPSCreg Team <hpscereg-info@charite.de> le confirmará la asignación de Spanish Stem Cell Bank a su perfil por correo electrónico. En este momento su estado en Dashboard (My institutions) de Applicant cambiará a Registrant para esta institución.
- Volver a Generator Institution> seleccionar en el desplegable Spanish Stem Cell Bank.
- El nombre provisional (Provisional name) debe de empezar por ES.
- En Alternative names introduzca el nombre de la línea con el que se deposita en el BNLC, según las indicaciones de Nomenclatura del BNLC:

<https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/BIOBANCOS/BNLC/Paginas/SolicitudDeposito.aspx>



ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA
LÍNEA CELULAR **BS PBiPS46-Sv4F-10** 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: Silenciamiento de los transgenes de reprogramación

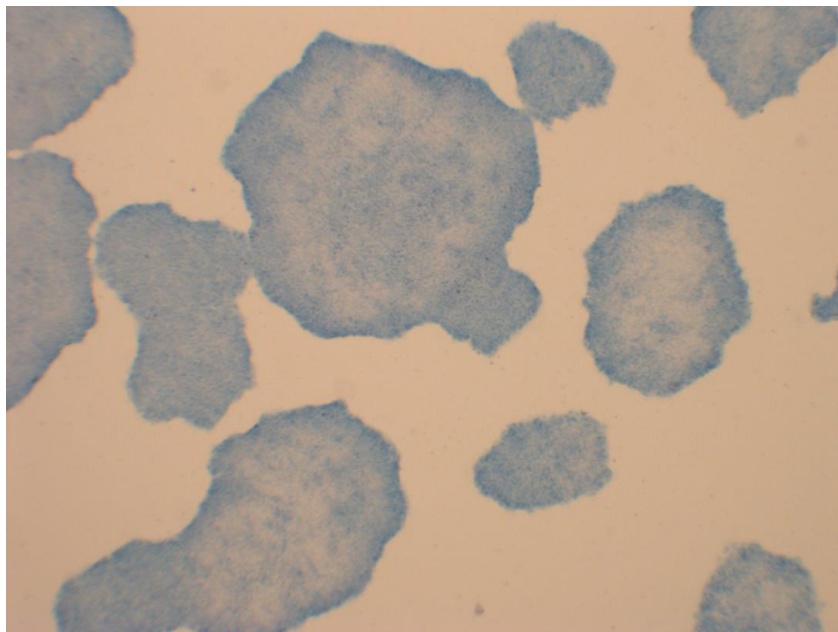
Anexo 6: Confirmación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

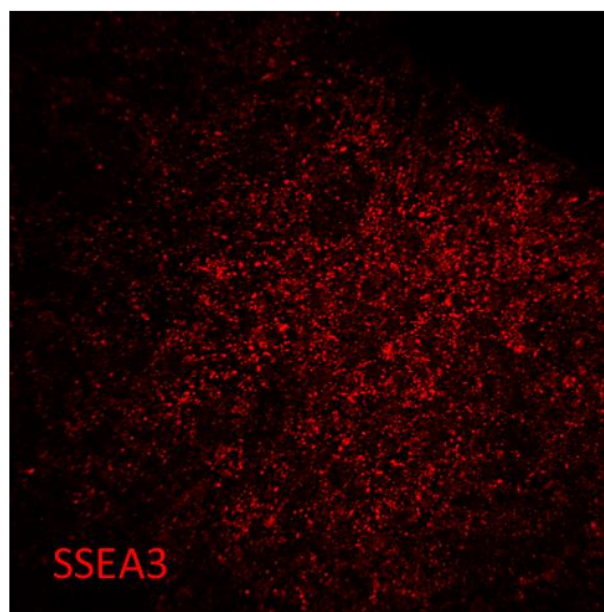
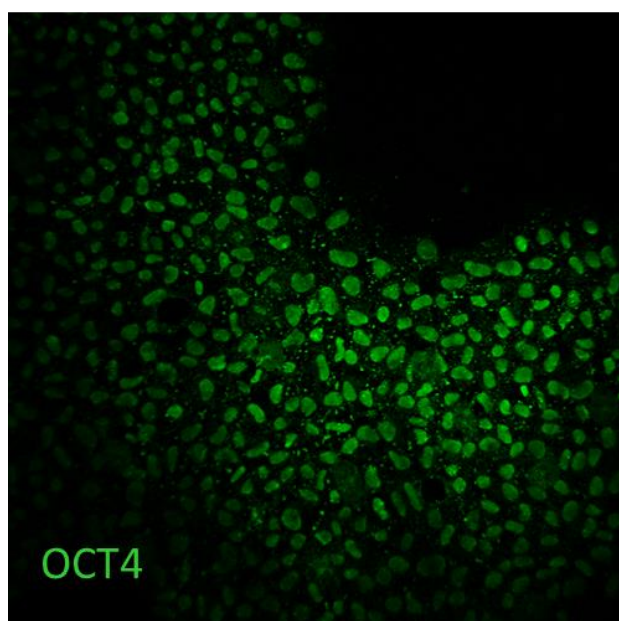
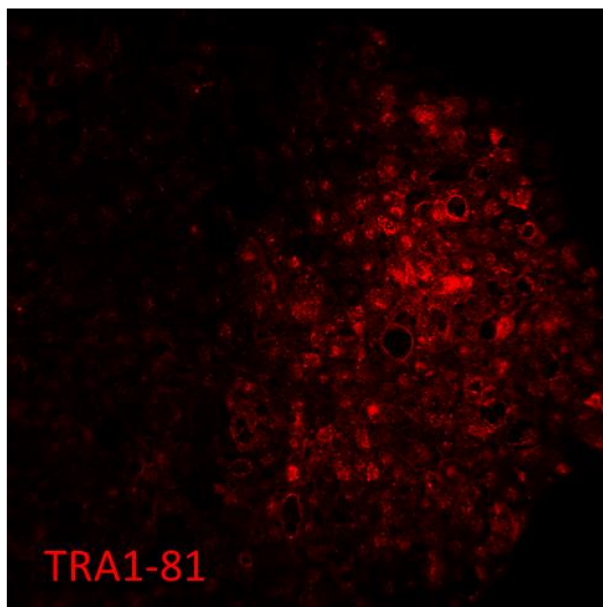
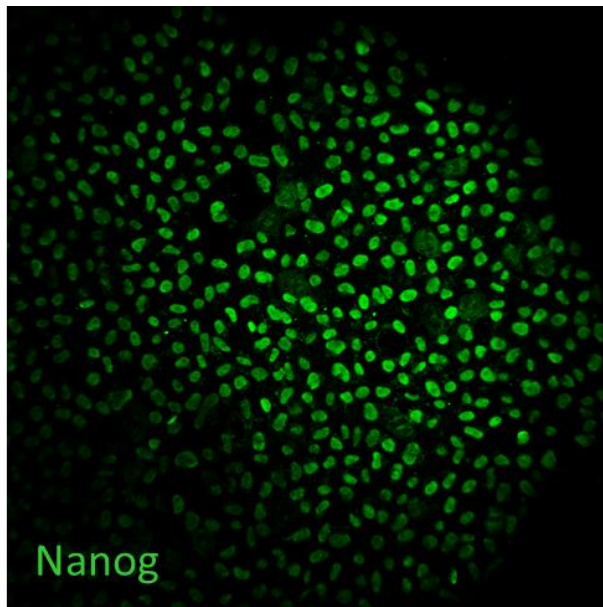


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

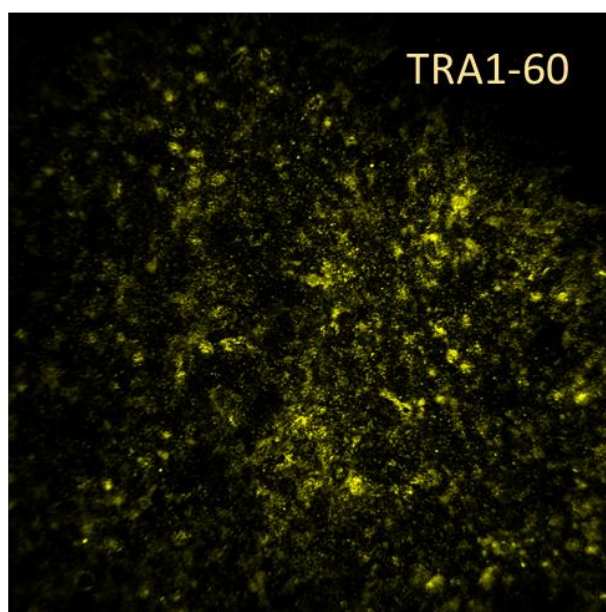
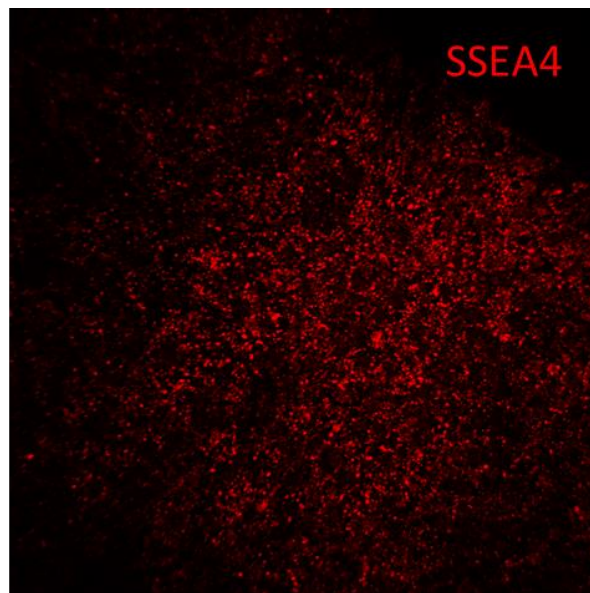
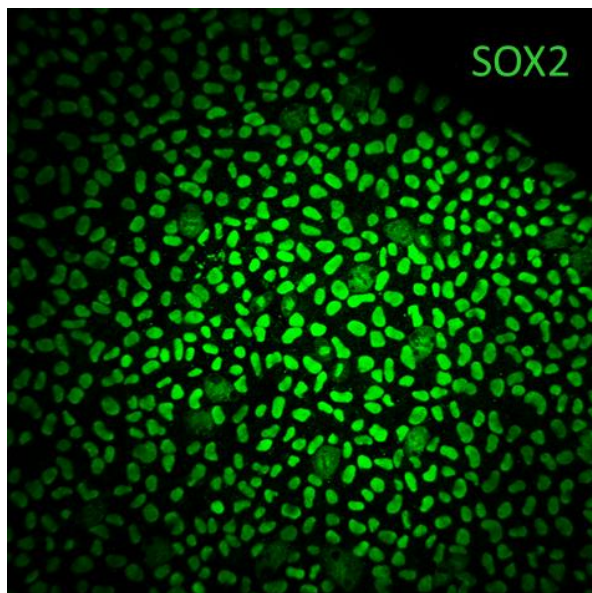


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog, TRA1-81, OCT4 y SSEA3.



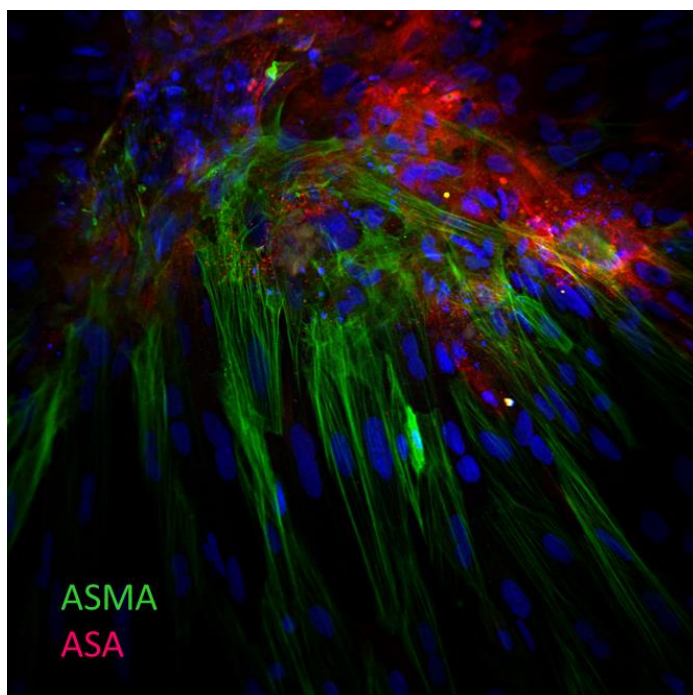
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

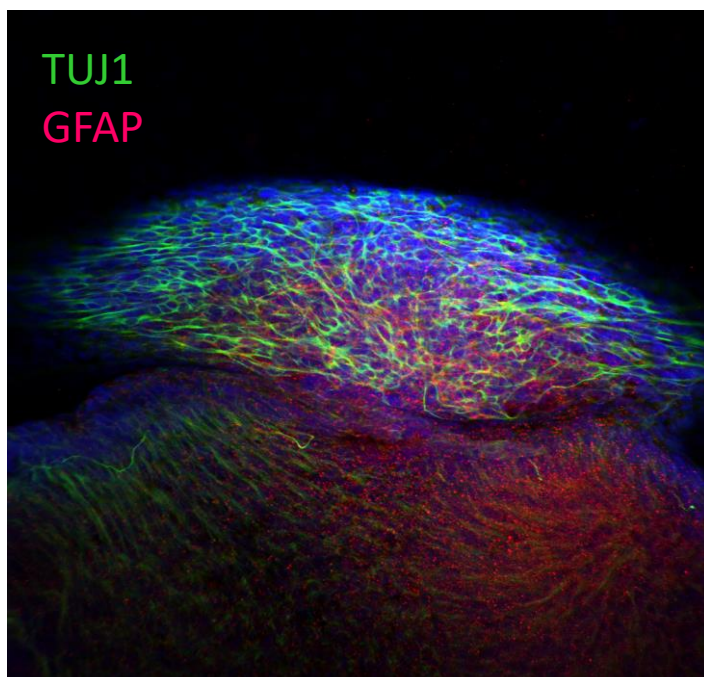


Anexo 2

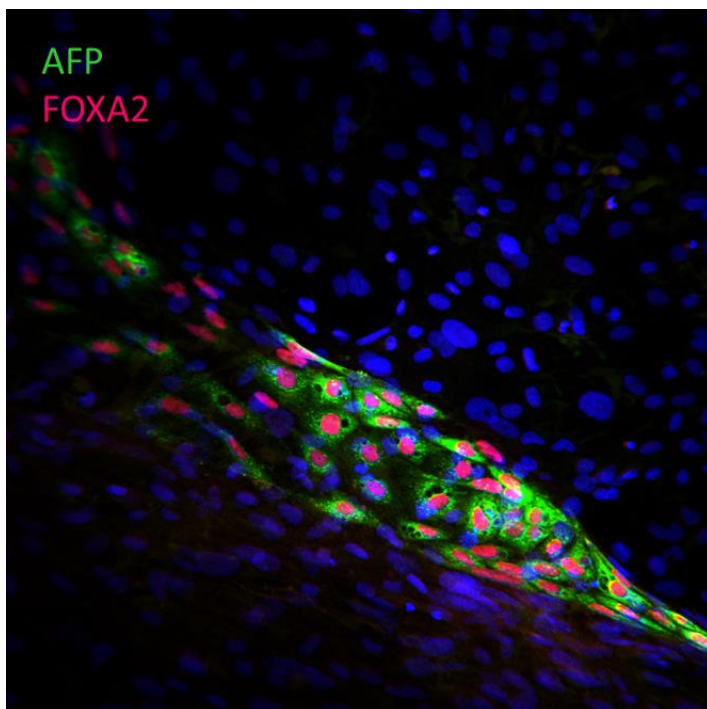
Diferenciación *in vitro*



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

ESTUDI CITOGENETIC

Case name: 92410481

NHC: CT0107

Nombre y Apellidos: BS PBiPS46 Sv4F-10 p14

Tipo de muestra: CM

Servicio: CMRB



Case: 92410481 Slide: 1 Cell: 6

Resultado: 46,XY



Anexo 4

Resultado microsátélites

Los resultados obtenidos son estudiados mediante el programa informático GeneMapper® 3.2. De acuerdo con la información suministrada por Promega® sobre su kit de amplificación GenePrint® 10 System, estos son los datos correspondientes de los alelos existentes para cada uno de los diferentes loci STR (figura1):



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:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	Loci STRs analizados									
		TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
INVN02519A555ADNA002	BS PBiPS 46-Sv4F-10 p12	6, 8	29	11	12, 13	9, 11	9, 11	11, 12	X, Y	15, 17	8, 11

Granada, a 15 de Noviembre de 2019

Laboratorio de Biología Molecular
 Biobanco del SSPA

RESULTADOS:

En la siguiente tabla se indican los resultados correspondientes a las variantes alélicas para cada locus STR en la muestra analizada.

Código biobanco	Código origen del ADN de la línea celular	Loci STRs analizados									
		TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
INVN02519A525ADNA002	Brugada S RB12146	6, 8	29	11	12, 13	9, 11	9, 11	11, 12	X, Y	15, 17	8, 11

Granada, a 15 de Octubre de 2019

Laboratorio de Biología Molecular
Biobanco del SSPA

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en las células originales de las que procede.



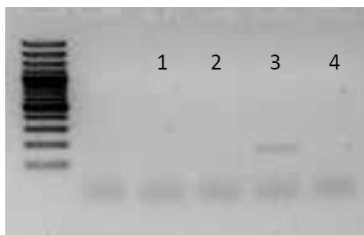
Anexo 5

Silenciamiento de los transgenes de reprogramación

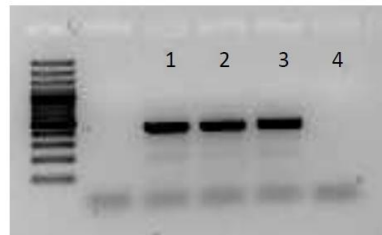
RT-PCR SENDAI 26/07/2019

1. BS PBiPS46 Sv4F-10, P7, 15.07.19
2. BS PBiPS46 Sv4F-13, P7, 09.07.19
3. Ctrl.BS PBiPS37 Sv4F-1, P8, 11.07.19
4. H2O

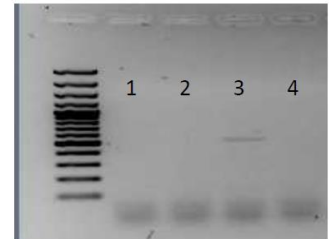
SeV (181pb)



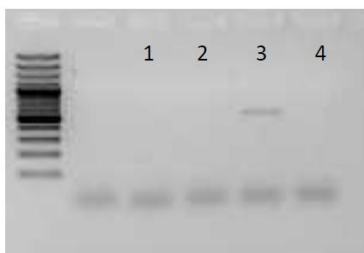
GAPDH



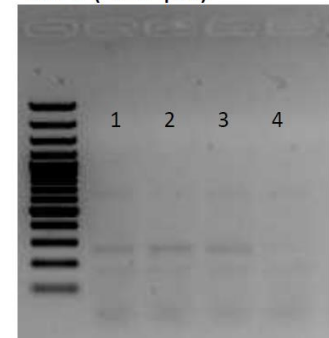
KOS (528 pb)



C-Myc (532 pb)



Klf4 (410 pb)

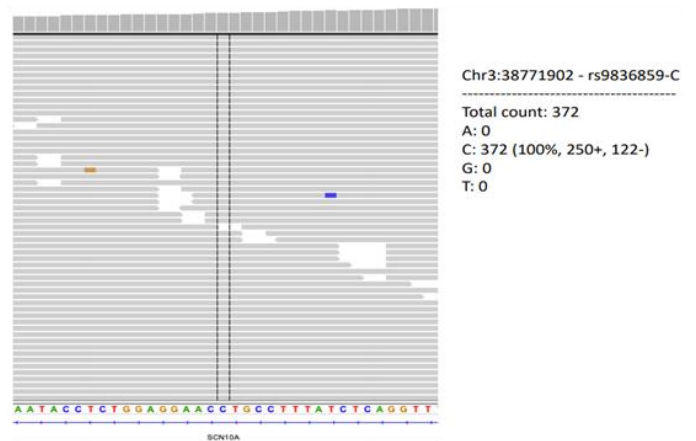
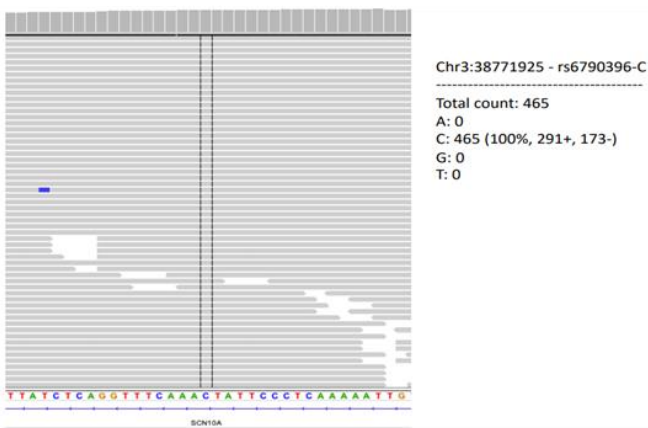
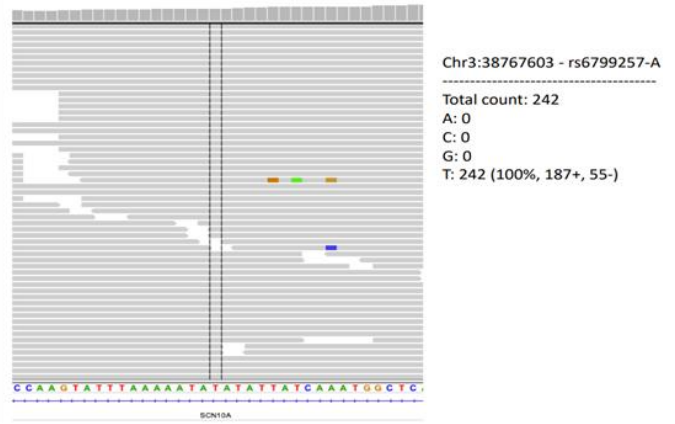
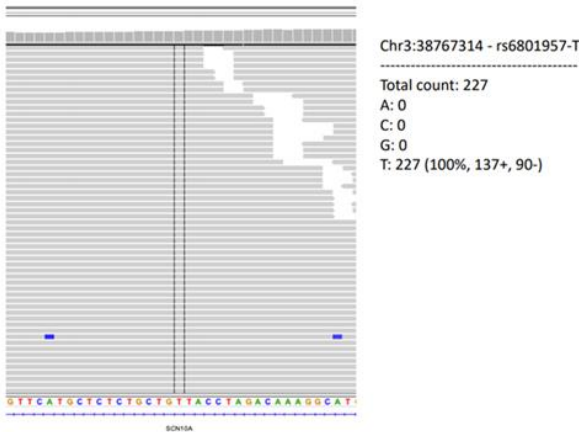


Silenciamiento de los transgenes de reprogramación
Análisis RT-PCR que muestra los niveles de expresión de mRNA de los marcadores de pluripotencia endógenos



Anexo 6
Confirmación de la presencia de la mutación

Sequencing Brugada syndrome patient RB12146 using short-read sequencing



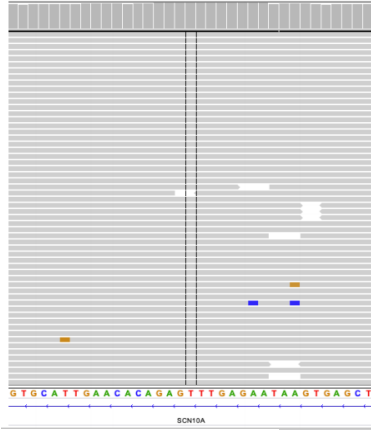


Chr3:38771994 - rs9874633-A

 Total count: 469
 A: 469 (100%, 176+, 293-)
 C: 0
 G: 0
 T: 0

GAAGGAATGAGTCAACAAGAGTGAATGAGATCTTG

SCN10A

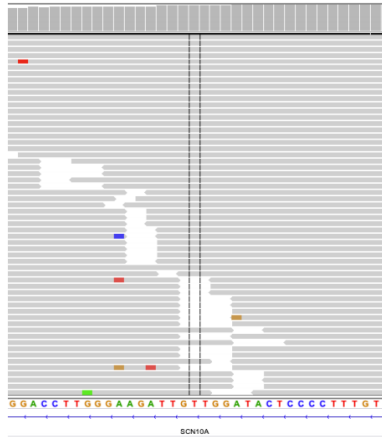


Chr3:38777554 - rs10428132-T

 Total count: 627
 A: 0
 C: 0
 G: 4 (1%, 1+, 3-)
 T: 623 (99%, 313+, 310-)

GTGCATTGAAACACAGAGTTTGAGAATAAGTGAGCT

SCN10A



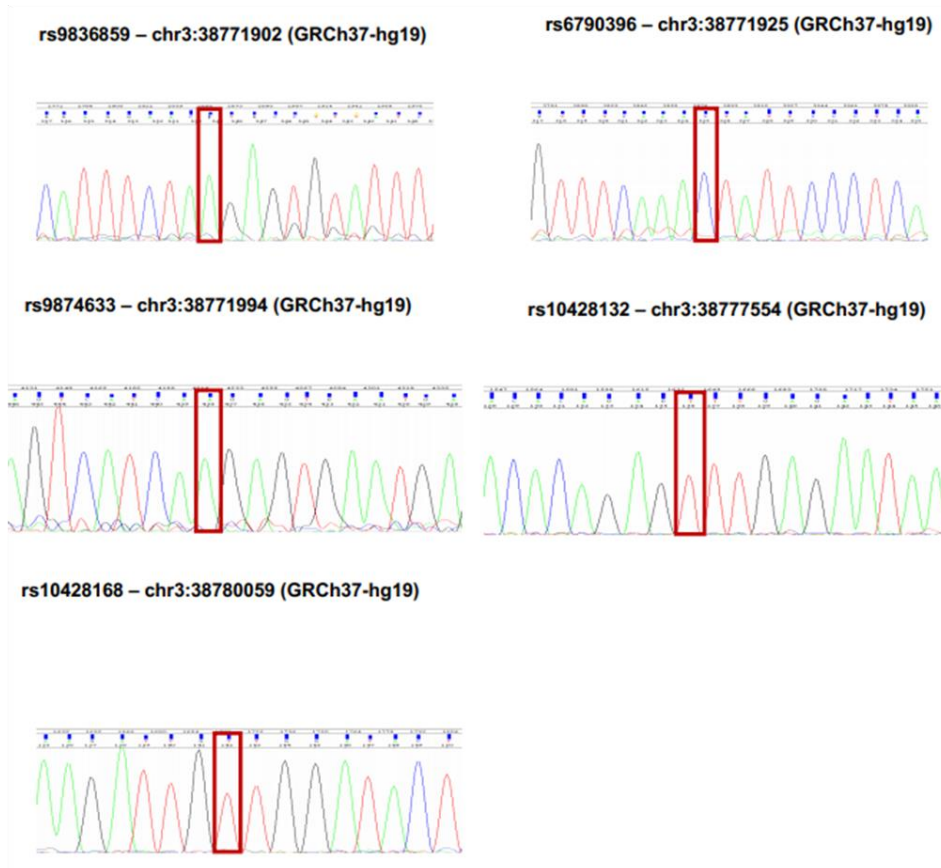
Chr3:38780059 - rs10428168-T

 Total count: 697
 A: 0
 C: 0
 G: 0
 T: 697 (100%, 403+, 294-)

GGACCCTTGGGAAGATTGTTGGATACTCCCTTTGT

SCN10A

Sequencing hiPSC from Brugada syndrome patient RB12146 using Sanger sequencing



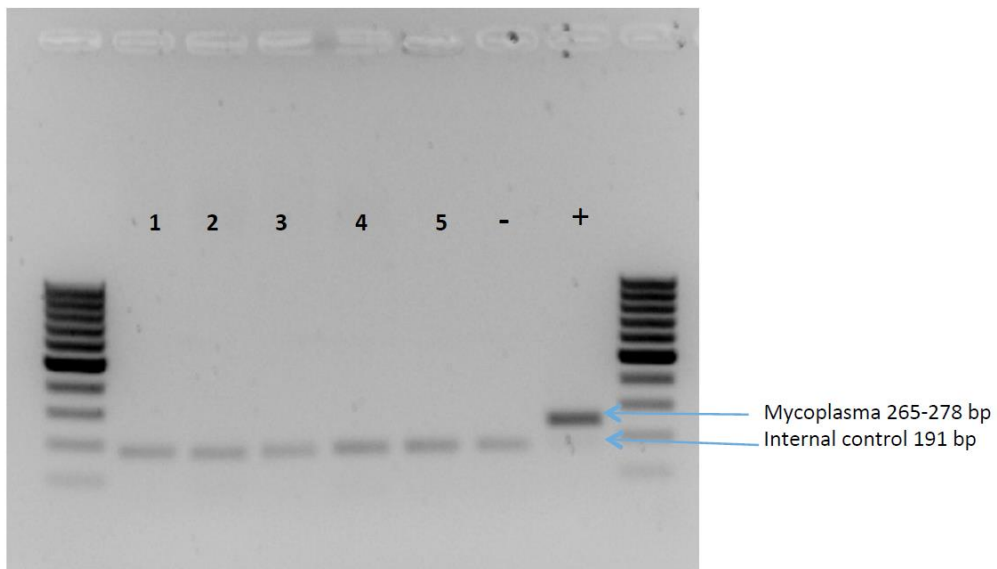
Se presentan los resultados de la secuenciación en células del paciente con Síndrome de Brugada y la comprobación de las mismas en la iPSC generada



Anexo 7

Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 02/10/2019



5. BS PBiPS 46-Sv4F-10 p10