

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:

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>	MD FiPS3236-Sv4F-9
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 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.	Fibroblastos procedentes de biopsia de piel Dermal fibroblasts from skin biopsy.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Masculino/ 5 años Male/5 years
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Alteración de neurotransmisores No Yes (specify)
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) c.692T>C; c.152+1G<A /ATAD3C No Yes (specify)

<i>genetic origin?</i>	
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>	24.11.2016
Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i>	4.08.2020
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>	Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 4) Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical to the markers of the iPS line (Annex 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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Generación de las células de pluripotencia inducida (iPSC) a partir de fibroblastos (p4) del paciente 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. The induced pluripotent stem cells (iPSC) were generated from fibroblasts (p4) from a 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.
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, 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)
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) o mediante contenedor de isopropanol a -80°C (-1°C/min). Los viales se han descongelado a 37°C mediante descongelación rápida. 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.
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>	p15

<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"/> 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 Nanog inmunocitoquímica Sox 2 inmunocitoquímica SSEA3 inmunocitoquímica SSEA4 inmunocitoquímica TRA-1-60 inmunocitoquímica TRA-1-81 inmunocitoquímica Fosfatasa. Alk actividad	p11 p11 p11 p11 p11 p11 p11 p15	+	Anexo 1/ Annex 1	
Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i>	Comentarios <i>Method</i>	Método <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	
Cuerpos embrioides <i>Embryoid bodies</i>		Ectodermo inmunocit <i>Ectoderm</i>	TUJ1/GFAP	15	+/ Anexo 2/Annex 2
		Mesodermo inmunocit <i>Mesoderm</i>	ASMA	15	+/ Anexo 2/Annex 2
		Endoderm inmunocit. <i>Endoderm</i>	AFP/FOXA2	15	+/ Anexo 2/Annex 2
Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	Comentarios <i>Method</i>	Método <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</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 (p11/p16) Anexo 3/ 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	Los marcadores de microsatélites de la muestra inicial de fibroblastos coinciden con los de la línea de iPS generada (Anexo 4) Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical to the markers of the iPS line (Annex 4)
Test de integración) <i>Integration Test)</i>	No procede, debido a que se trata un método no-integrativo Not applicable, due to non-integrating reprogramming methodology
Test de silenciamiento) <i>Silencing Test)</i>	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). 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).
Confirmación de la presencia de la mutación de las células de origen <i>Confirmation of the mutation in the original cells</i>	Se muestra en el anexo 6. It is showed in Annex 6.
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo por PCR (Anexo 7) Negative by PCR (Annex 7)

SECCIÓN 3
Section 3**DATOS DEL DEPOSITANTE**
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Pilar Bayona Bafaluy	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> C/ Pedro Cerbuna, 12, 50009 Zaragoza
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Facultad Ciencias, Universidad de Zaragoza	Teléfono (phone): 976762843 Fax: E-mail: pbayona@unizar.es

BAYONA
BAFALUY
MARIA PILAR
- 73197155T
Firmado digitalmente
por BAYONA BAFALUY
MARIA PILAR -
73197155T
Fecha: 2022.03.15
15:53:24 +01'00'

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)

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) Legal Representative of the Department/Centre)</i> 25448429X Firmado digitalmente OSCAR LOPEZ por 25448429X (R: OSCAR LOPEZ (R: G99426132) Fecha: 2022.03.11 G99426132) 12:58:58 +01'00' Fecha/ Date:	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> BAYONA BAFALUY Firmado digitalmente MARIA PILAR - por BAYONA BAFALUY 73197155T MARIA PILAR - Fecha: 2022.03.15 15:52:57 +01'00' Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i>	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Avda. San Juan Bosco 13, edificio CIBA Zaragoza 50009	Teléfono /Telephone: Fax: E-mail:

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:	ANA MARIA VEIGA LLUCH Firmado digitalmente - DNI por ANA MARIA 46109740F VEIGA LLUCH - DNI Fecha: 2022.03.16 07:42:12 +01'00'
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: 93.3100360 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://hpscreg.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 <hpscreg-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 Intitution> 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 **MD FiPS3236-Sv4F-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: Resultados microsatélites

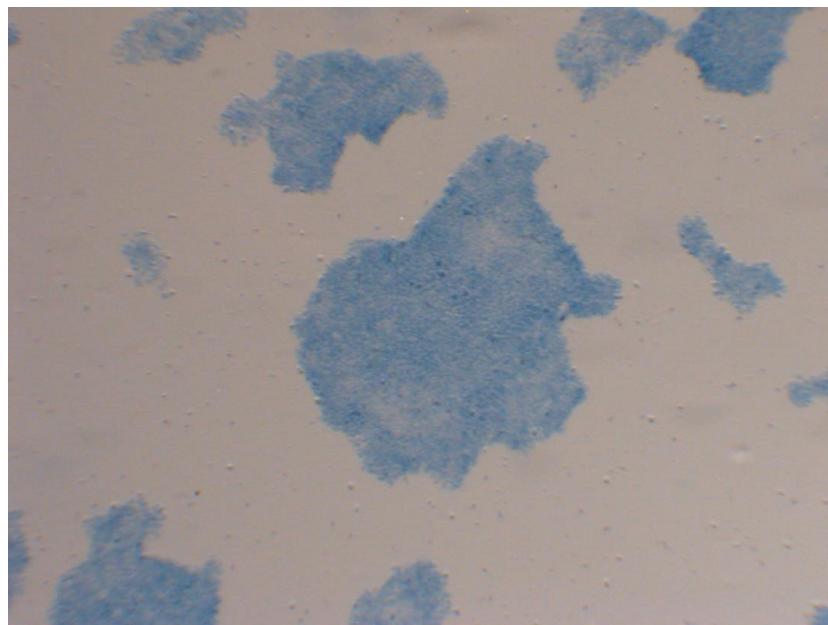
Anexo 5: Ausencia de los transgenes de reprogramación

Anexo 6: Confirmación de la presencia de la mutación

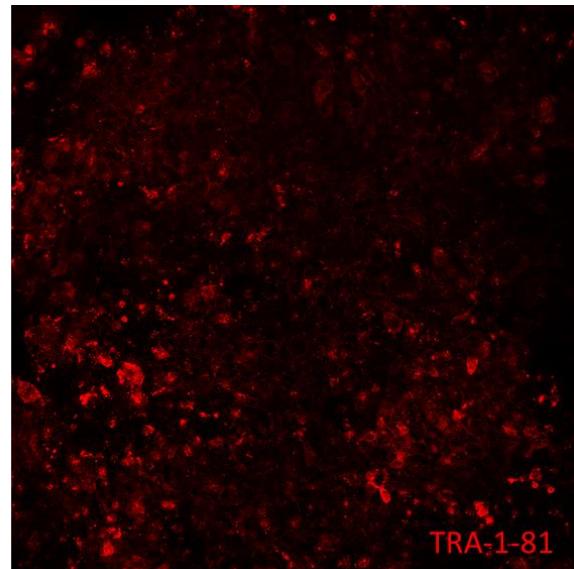
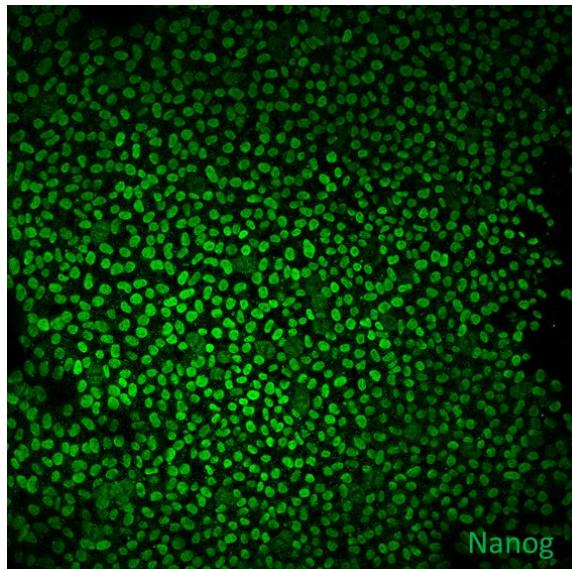
Anexo 7: Resultado test de micoplasma

Anexo 1

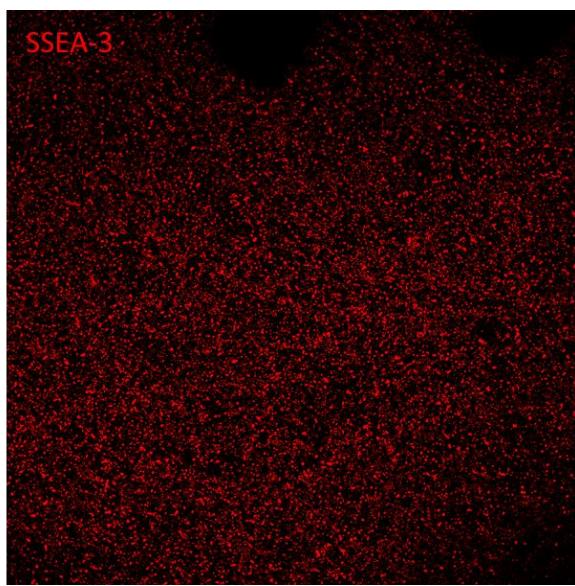
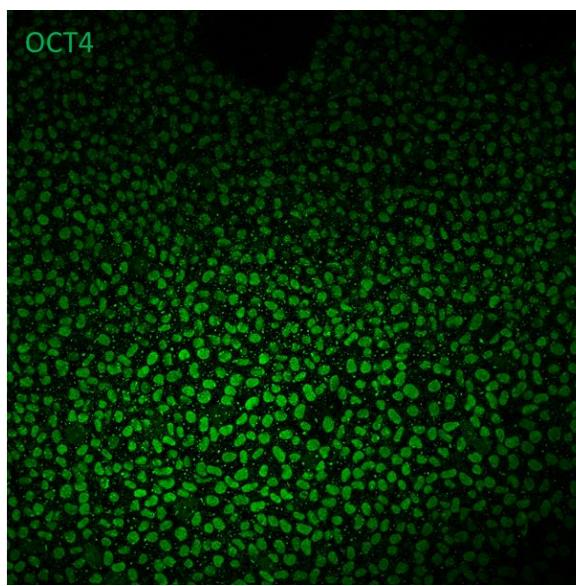
Fenotipo. Marcadores de pluripotencia



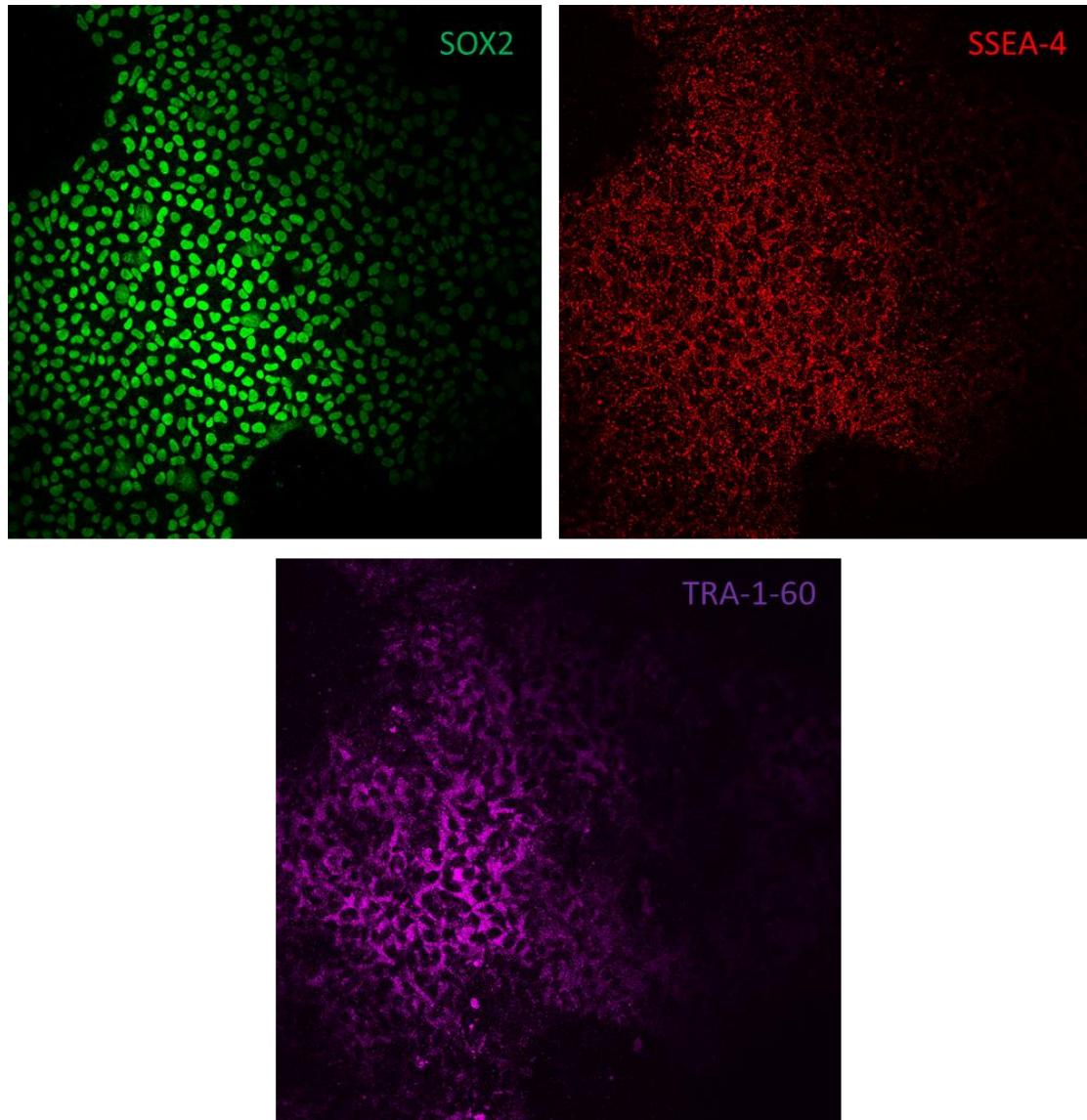
Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



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



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

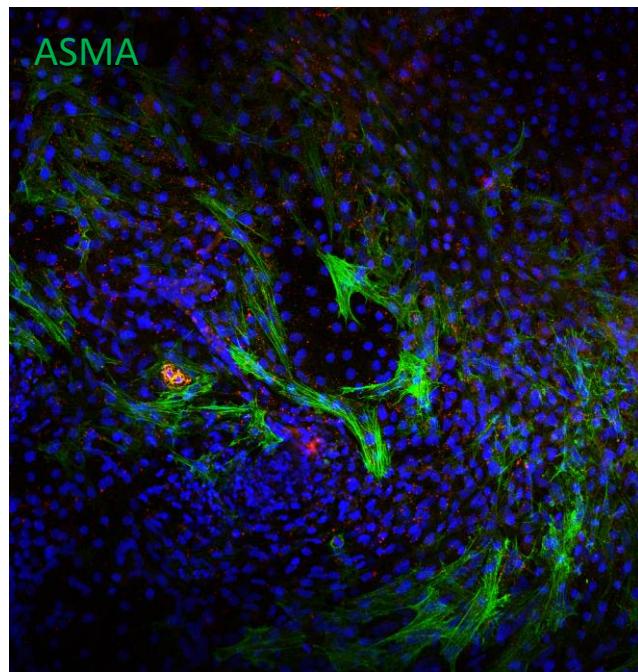


Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

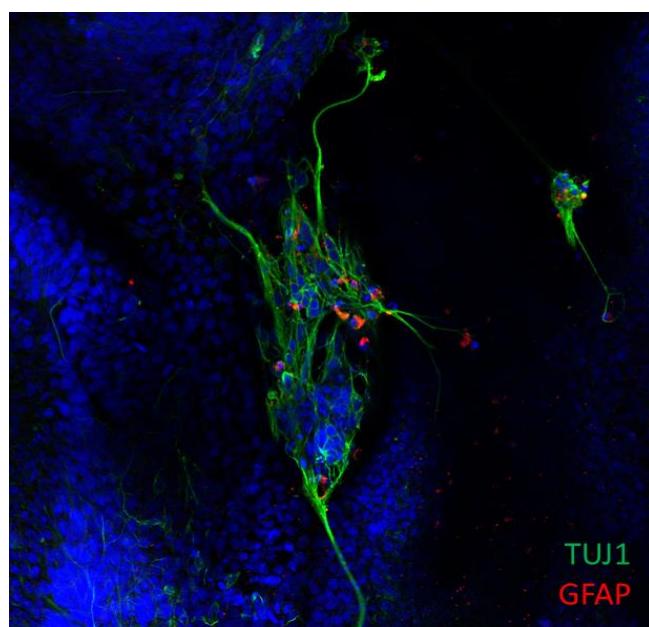
Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60



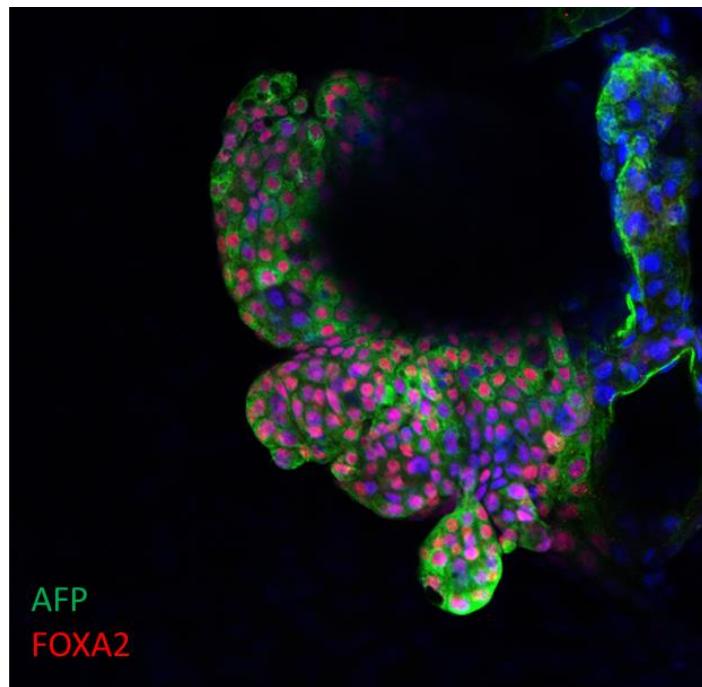
Anexo 2
Diferenciación *in vitro*



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
Cariotipo

ESTUDIO CITOGENETICO

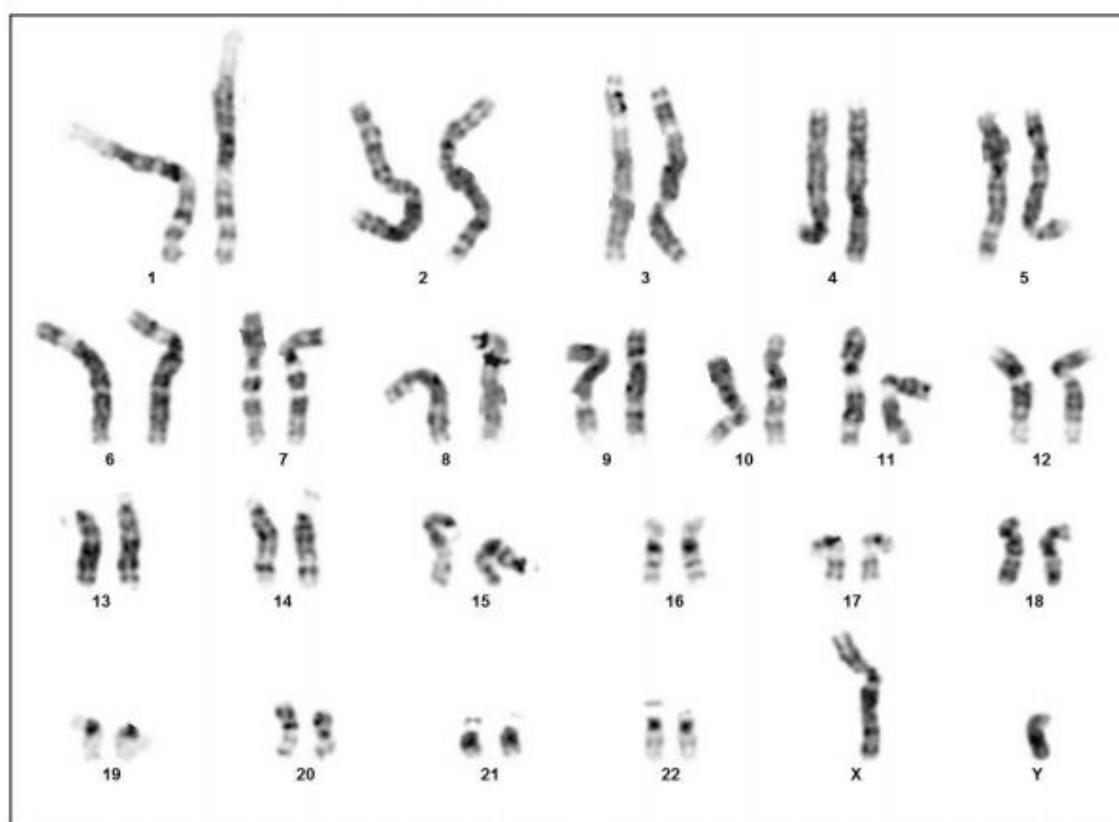
Case name: 0130936

Servicio: IDIBELL

NHC: CT0195

Tipo de muestra: CM

Nombre y Apellidos: MDFiPS3236-Ep6F-9 p16



Case: 0130936 Slide: 1 Cell: 3

Resultado: 46,XY



Anexo 4
Resultado microsatélites

P-CMR[C]

RESULTADOS:

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

Línea celular	Locí STRs analizados									
	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
MD FiPS3236-Sv4F-9 p16	6	30; 31	10; 11	11; 12	11	12; 13	10; 12	X; Y	16; 18	8; 9

P-CMR[C]

RESULTADOS:

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

Línea celular	Locí STRs analizados									
	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
Fb 3236 fibroblasts, P4, 0,3M cells, 30.07.20	6	30; 31	10; 11	11, 12	11	12; 13	10; 12	X, Y	16, 18	8; 9

Barcelona, a 02 de noviembre de 2020

Laboratorio Biología Molecular

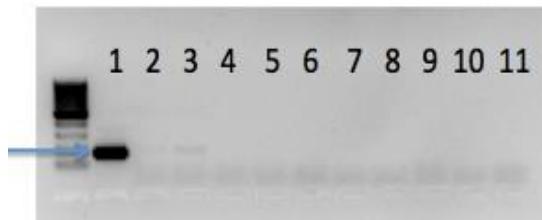
P-CMRC

Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en los fibroblastos de los que procede.

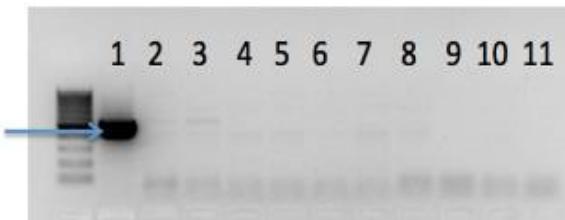
Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación

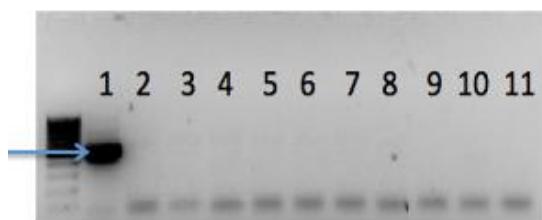
Sev (181 bp)



c-Myc (532 bp)



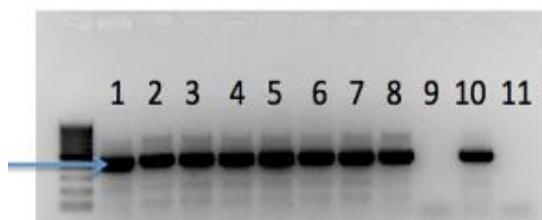
KOS (528 bp)



Klf4 (410 bp)



GAPDH



RT-PCR SENDAI 2.0 03/11/2020

1. Control + SENDAI 2.0
2. MD FiPS3236 Sv4F-1, P7, mg, 26.10.20
3. MD FiPS3236 Sv4F-2, P8, mg, 26.10.20
4. MD FiPS3236 Sv4F-5, P8, mg, 22.10.20
5. MD FiPS3236 Sv4F-6, P8, mg, 26.10.20
6. MD FiPS3236 Sv4F-7, P8, mg, 26.10.20
7. MD FiPS3236 Sv4F-9, P8, mg, 26.10.20
8. MD FiPS3236 Sv4F-10, P8, mg, 26.10.20
9. Sample 2 NO RT
10. Rb20234-C17 p12 (NEGATIVE CONTROL EPISOMAL SAMPLE)
11. H₂O

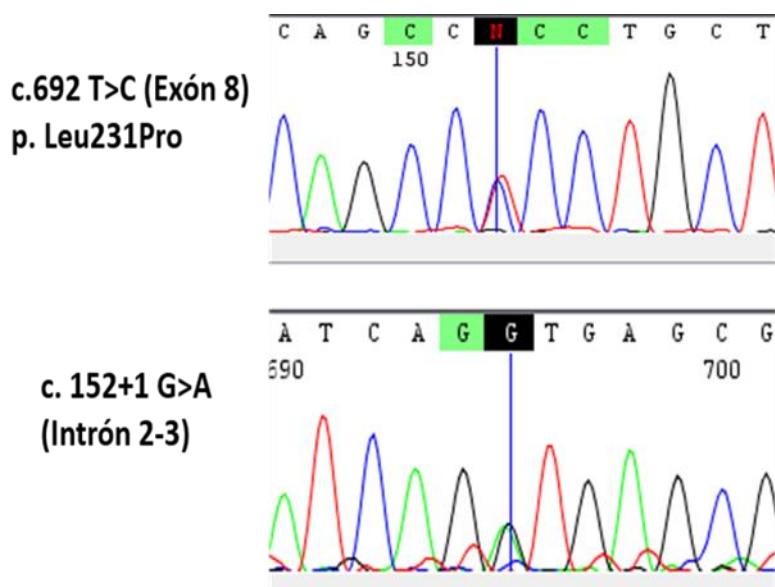
Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



Anexo 6

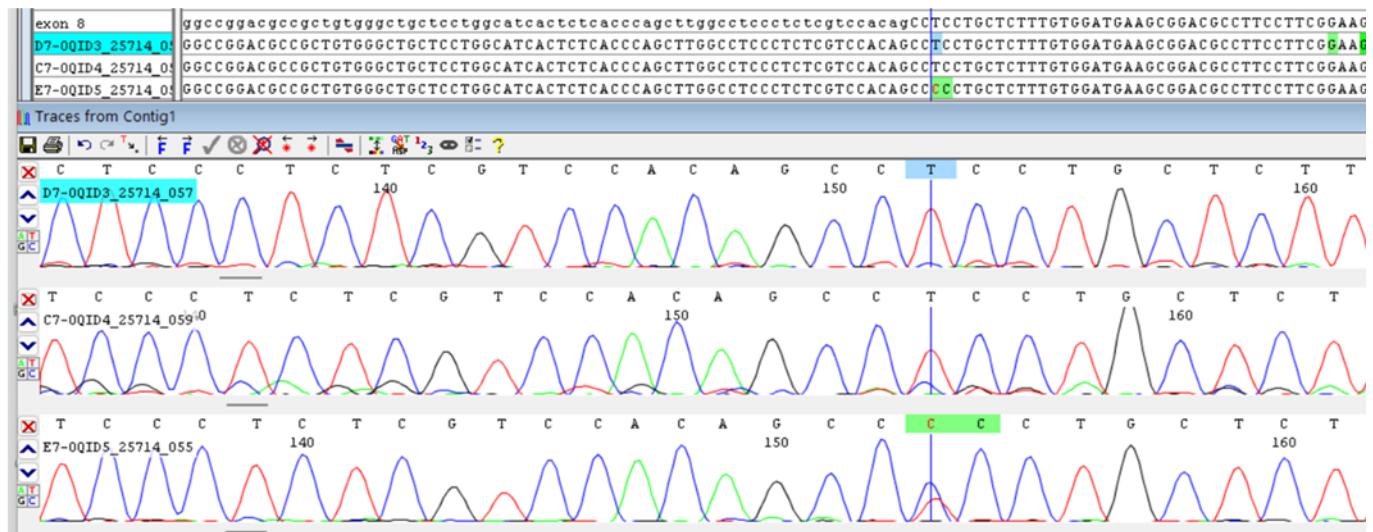
Confirmación de la presencia de la mutación

Fb ATAD3C

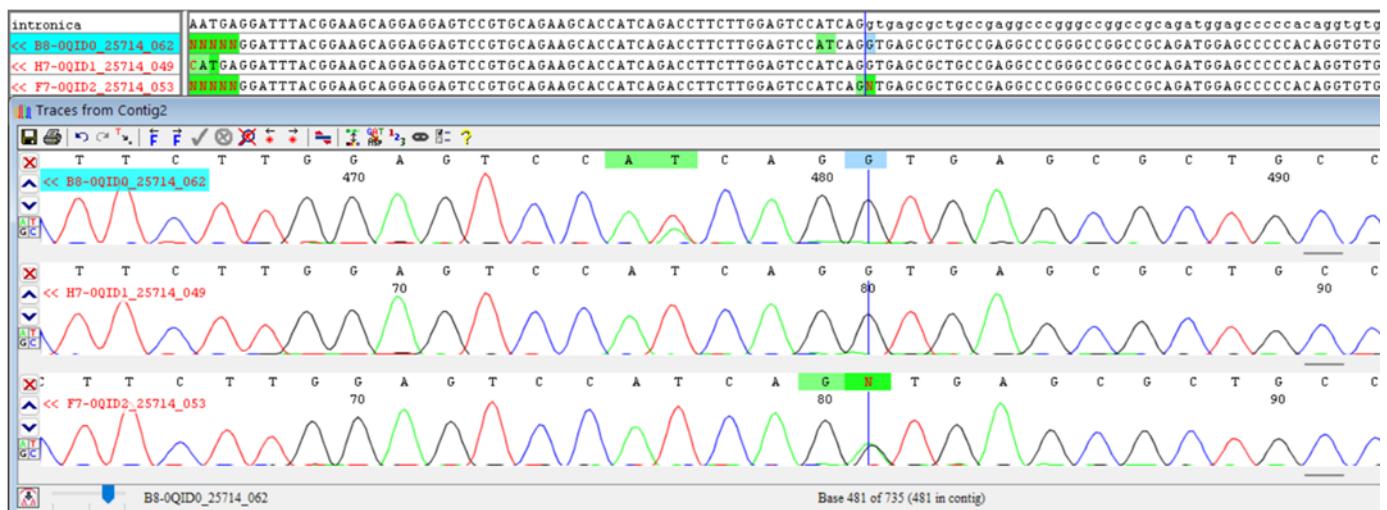


Confirmación de las mutaciones *ATAD3C* en fibroblastos de la muestra de *ATAD3c* (Fb3236)

Mutación c.692T>C Leu231Pro (Exón 8) en ATAD3C



Mutación c.152+1 G>A (Intrón 2-3) en ATAD3C

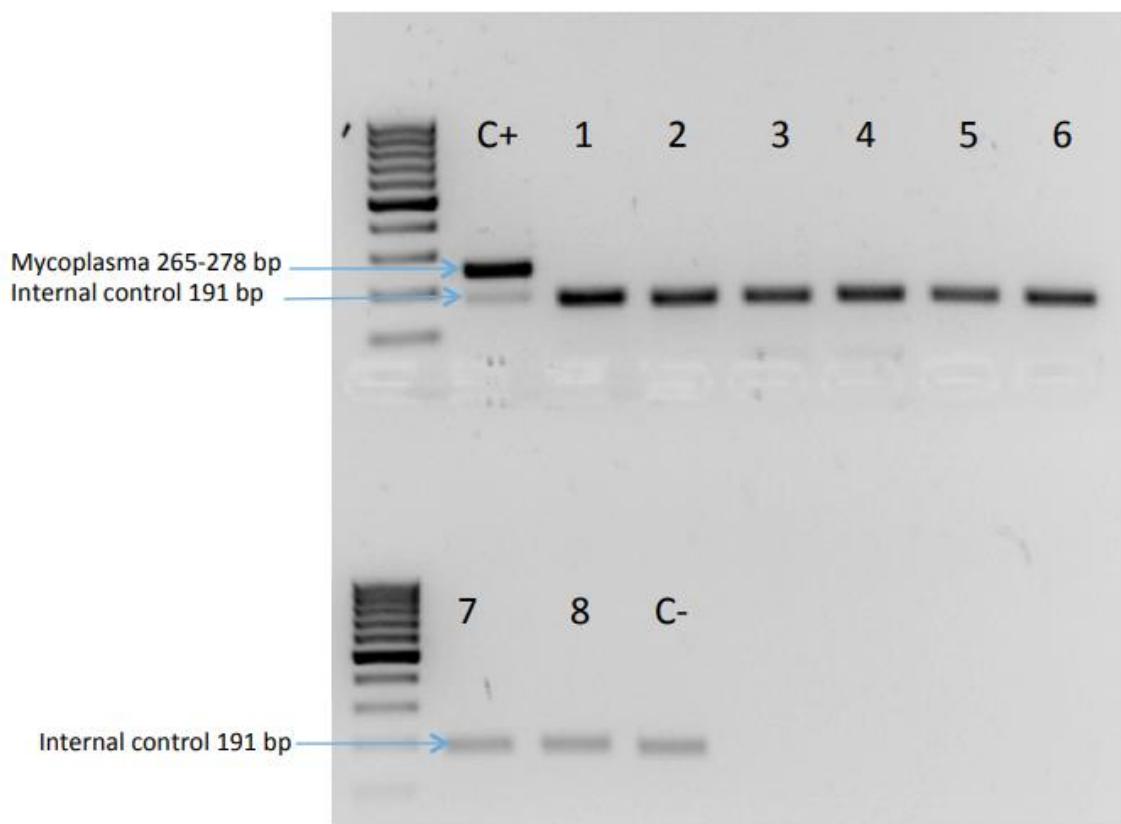


Confirmación de las mutaciones ATAD3C en MD FiPS3236-Sv4F-9



Anexo 7
Resultado test de micoplasma

Mycoplasma test (VenorGeM Classic kit) 13/01/2021



1. MD FiPS3236-Sv4F-9 p15
2. MD FiPS3304-Sv4F-5 p11