

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 iPSC 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 FiPS3304-Sv4F-5
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>	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/ 14 años Male/14 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 <i>No</i> <i>Yes (specify)</i>
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) c.C1036T / TEFM <i>No</i> <i>Yes (specify)</i>

<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>	12.2.2018
Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i>	30.7.2020
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 iPSC generada (Anexo 4) Microsatellite markers of the initial fibroblasts sample are identical to the markers of the iPSC 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)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Generación de las células de pluripotencia inducida (iPSC) a partir de fibroblastos (p6) de un paciente con alteración de neurotransmisores 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 (p6) from a patient with neurotransmitter alterations, 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>	p14

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?
Has the line been genetically modified?

Sí Yes **No** No

Especificar:
Specify:

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	p12	+	Anexo 1/ Annex 1	
	Nanog	inmunocitoquímica	p12	+		
	Sox 2	inmunocitoquímica	p12	+		
	SSEA3	inmunocitoquímica	p12	+		
	SSEA4	inmunocitoquímica	p12	+		
	TRA-1-60	inmunocitoquímica	p12	+		
	TRA-1-81	inmunocitoquímica	p12	+		
	Fosfatasa. Alk actividad		p12	+		
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>	
Cuerpos embrioides <i>Embryoid bodies</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	inmunocit	TUJ1/GFAP	12	+/+	Anexo 2/Annex 2
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	inmunocit	ASMA/ASA	12	+/+	
	Endodermo <i>Endoderm</i>	inmunocit.	AFP/FOXA2	12	+/+	
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>	
Teratomas <i>Teratomas</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>					
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>					
	Endodermo <i>Endoderm</i>					

Cariotipo (pase) <i>Karyotype (passage)</i>	46, XY (p10/p14) 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	<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 to the markers of the iPS 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>	Se presenta en el Anexo 6. It is showed in Annex 6.
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	<p>Negativo por PCR (Anexo 7)</p> <p>Negative by PCR (Annex 7)</p>

SECCIÓN 3 **DATOS DEL DEPOSITANTE**
Section 3 *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

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

Confirmando 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:	BAYONA BAFALUY MARIA PILAR - 73197155T Firmado digitalmente por BAYONA BAFALUY MARIA PILAR - 73197155T Fecha: 2022.03.25 15:13:39 +01'00'
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Oscar López Lorente, Director Ejecutivo IIS Aragón	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Avda. San Juan Bosco 13, edificio CIBA Zaragoza 50009	Teléfono /Telephone: Fax: 25448429X E-mail: OSCAR LOPEZ (R: G99426132) Firmado digitalmente por 25448429X OSCAR LOPEZ (R: G99426132) Fecha: 2022.04.27 14:35:09 +02'00'

Firma del responsable de la generación de las iPSC/Centro de generación <i>Signature of the responsible for the iPSC generation/</i> <i>Generation center</i>	ANA MARIA VEIGA LLUCH - DNI 46109740F Firmado digitalmente por ANA MARIA VEIGA LLUCH - DNI 46109740F Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, sn=VEIGA LLUCH, givenName=ANA MARIA, serialNumber=IDCES-46109740F, cn=ANA MARIA VEIGA LLUCH - DNI 46109740F Fecha: 2022.05.03 10:55:17 +02'00'
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://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 **MD FiPS3304-Sv4F-5** 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

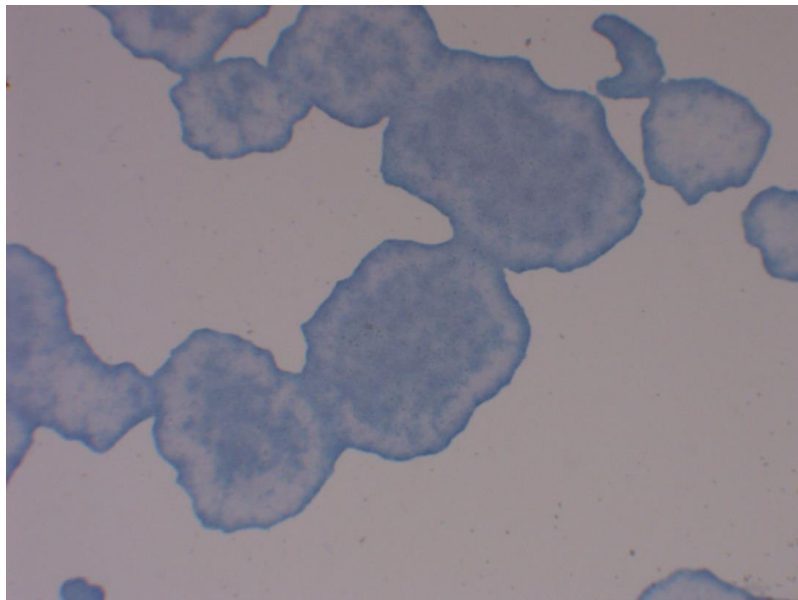
Anexo 6: Confirmación de la presencia de la mutación

Anexo 7: Resultado test de micoplasma

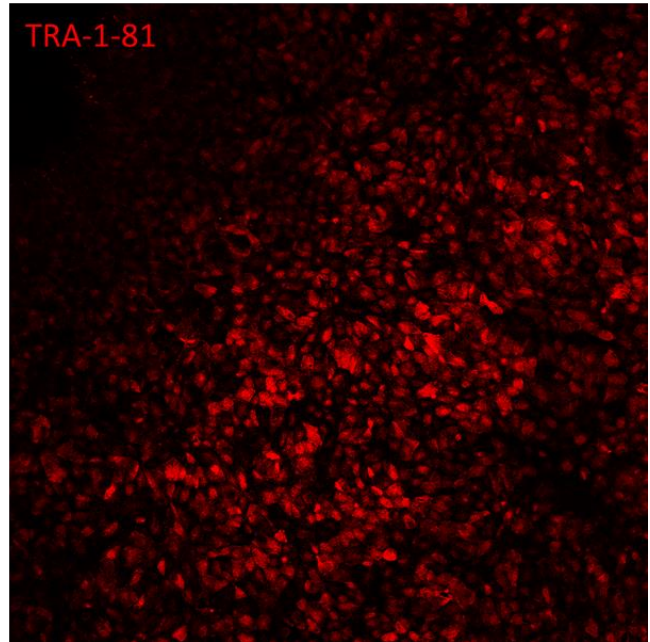
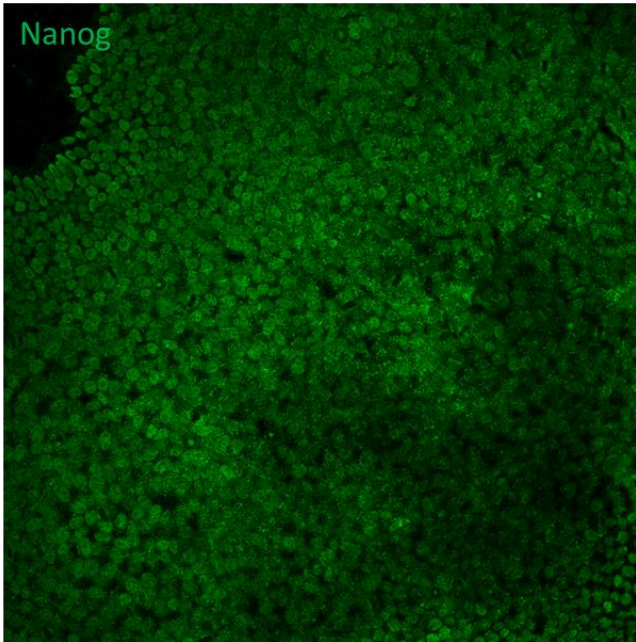


Anexo 1

Fenotipo. Marcadores de pluripotencia

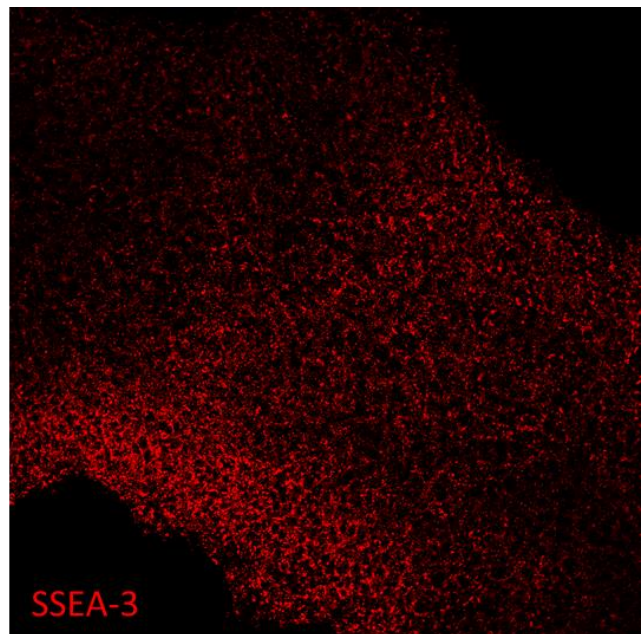
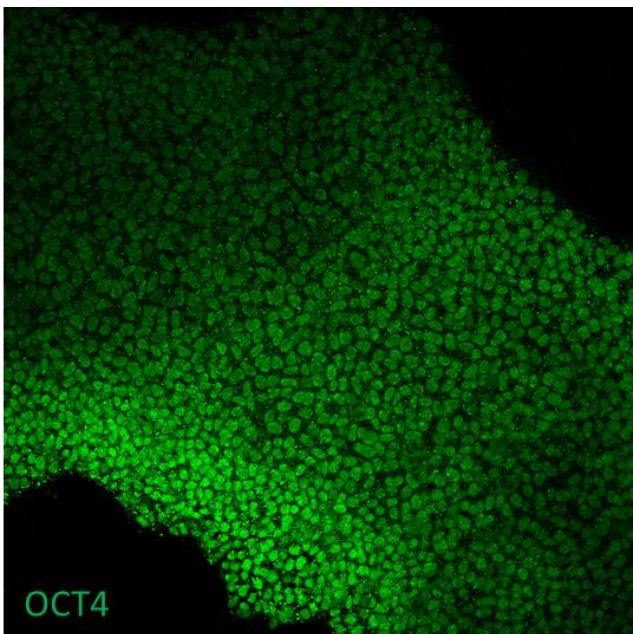


Actividad **fosfatasa alcalina** de la línea de células pluripotentes



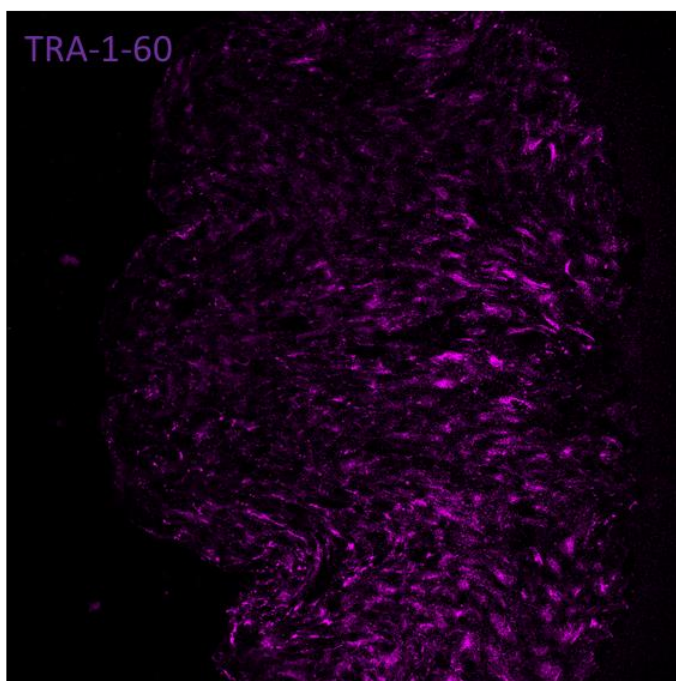
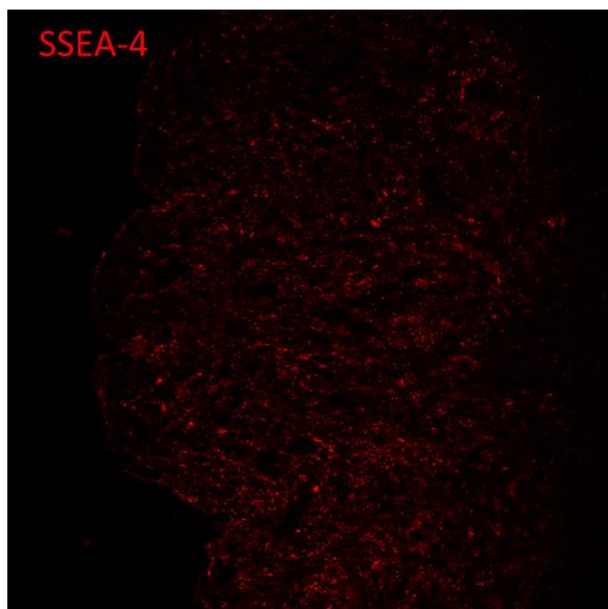
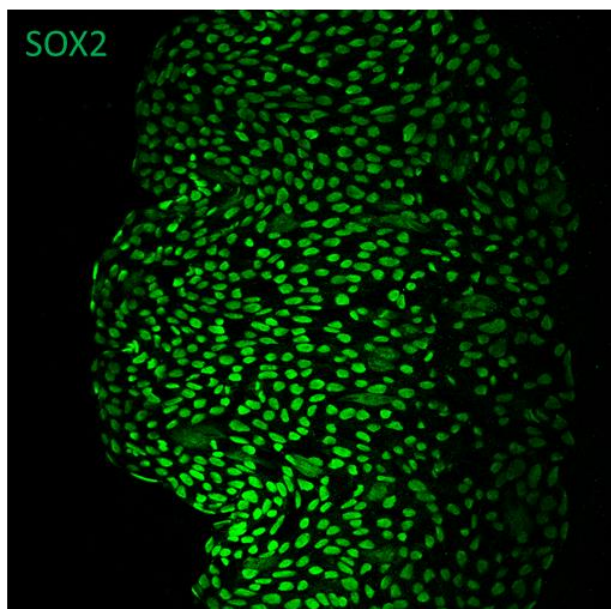
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Nanog y TRA1-81



Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Oct-4 y SSEA-3



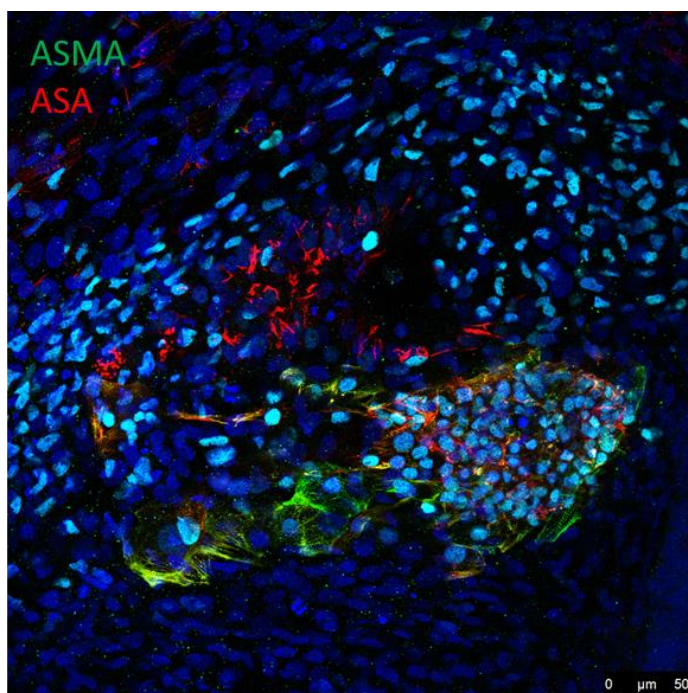
Resultado positivo por inmunocitoquímica para las proteínas de pluripotencia

Sox-2, SSEA-4 y TRA1-60

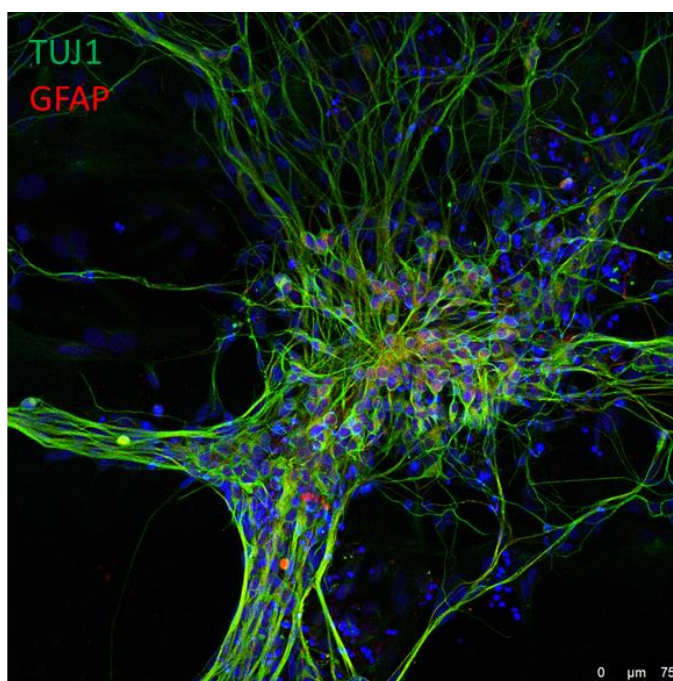


Anexo 2

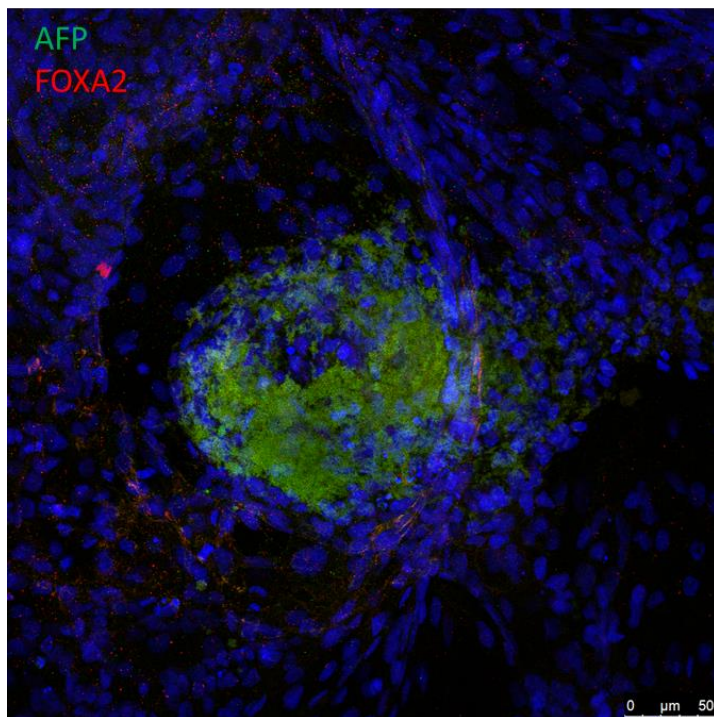
Diferenciación *in vitro*



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

ESTUDIO CITOGENETICO

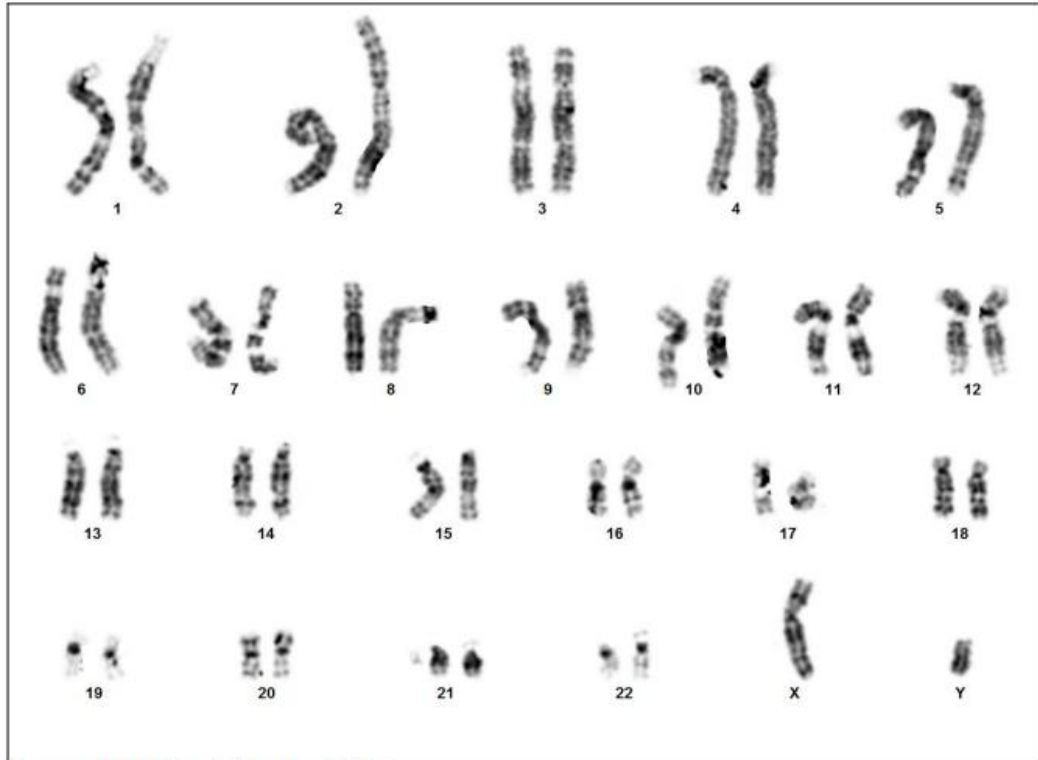
Case name: 10321044

Servicio: IDIBELL

NHC: CT0205

Tipo de muestra: CM

Nombre y Apellidos: MD FiPS3304-Sv4F-5 p14



Case: 10321044 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	Loci STRs analizados									
	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
MD FiPS3304-Sv4F-5 p14	6; 8	29; 31	10; 13	9; 10	9; 11	12; 13	9; 10	X; Y	16; 17	8; 11

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	Loci STRs analizados									
	TH01	D21S11	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSP1PO	AMEL	vWA	TPOX
MD Fb 3304, P5, 22.07.20	6; 8	29; 31	10; 13	9; 10	9; 11	12; 13	9; 10	X; Y	16; 17	8; 11

Barcelona, a 25 de noviembre de 2020

Laboratorio Biología Molecular

P-CMRC

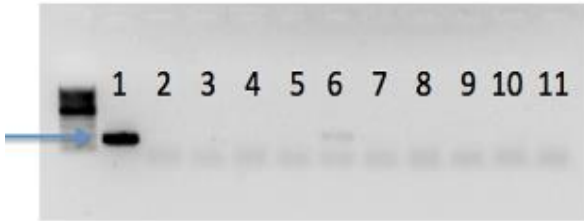
Análisis de microsatélites en la línea de hiPSC y en los fibroblastos de los que procede.



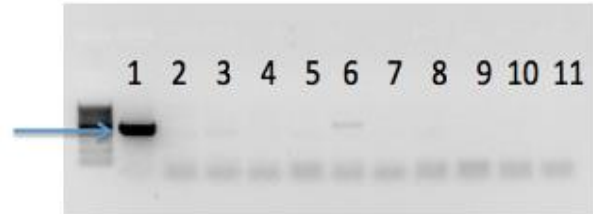
Anexo 5

Ausencia de los transgenes de reprogramación

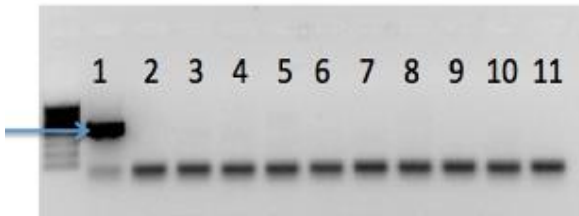
Sev (181 bp)



c-Myc (532 bp)



KOS (528bp)



Klf4 (410 bp)



GAPDH



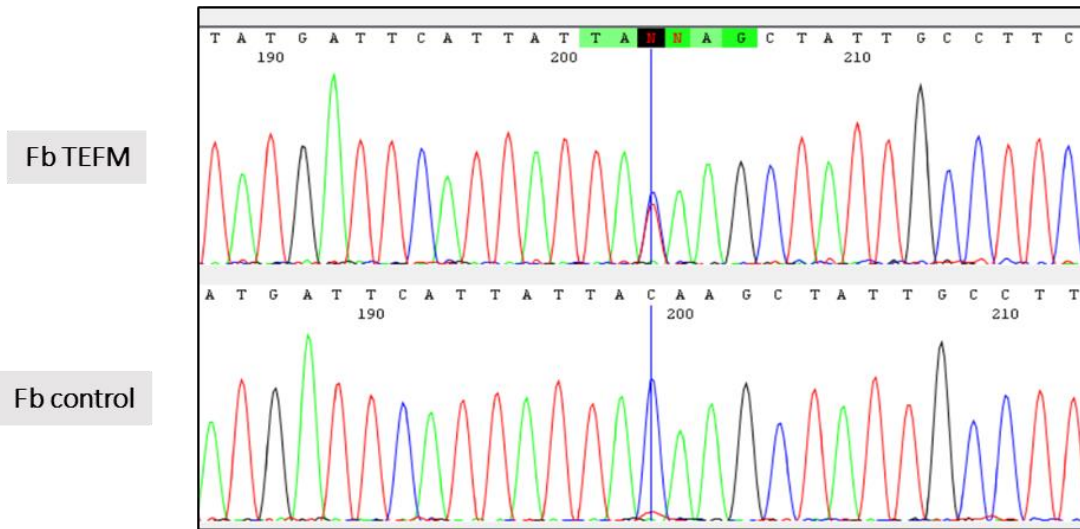
RT-PCR SENDAI 2.0 29/10/2020

1. Control + SENDAI 2.0
2. MD FiPS3304 Sv4F-1, P11, mg, 19.10.20
3. MD FiPS3304 Sv4F-2, P9, mg, 23.10.20
4. MD FiPS3304 Sv4F-5, P9, mg, 19.10.20
5. MD FiPS3304 Sv4F-6, P9, mg, 19.10.20
6. MD FiPS3304 Sv4F-7, P9, mg, 19.10.20
7. MD FiPS3304 Sv4F-10, P8, mg, 19.10.20
8. MD FiPS3304 Sv4F-12, P9, mg, 26.10.20
9. Sample 2 NO RT
10. Rb20234-C17 p12 (NEGATIVE CONTROL EPISOMAL SAMPLE)
11. H2O

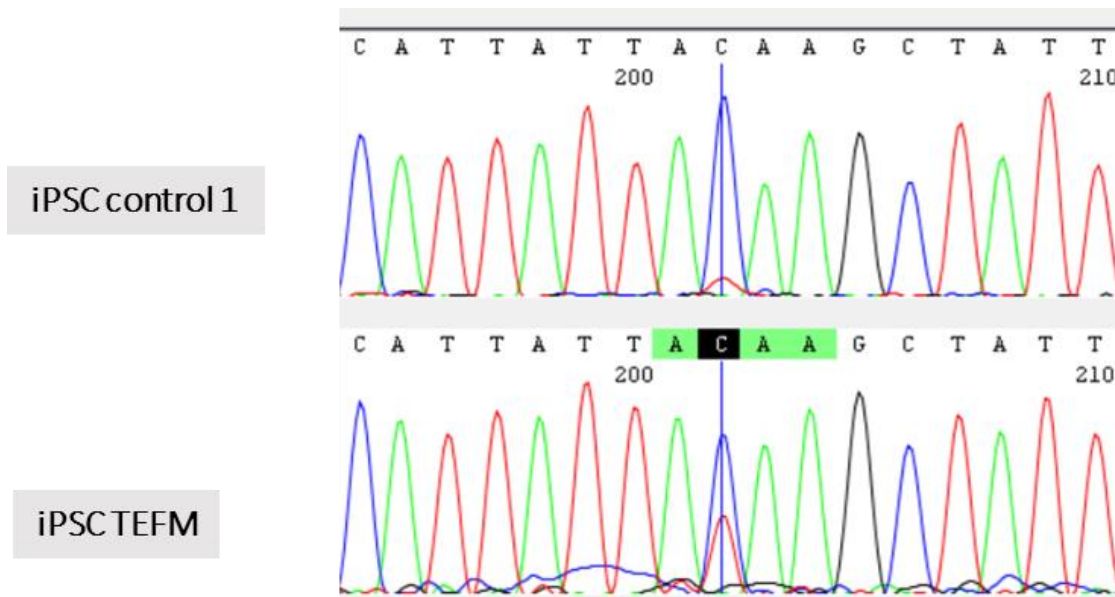
Ausencia de los transgenes de reprogramación. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los transgenes indicados. Se muestra expresión relativa a GAPDH



Anexo 6
Confirmación de la presencia de la mutación



Presencia de la mutación TEFM (C.1036C>T) en fibroblastos

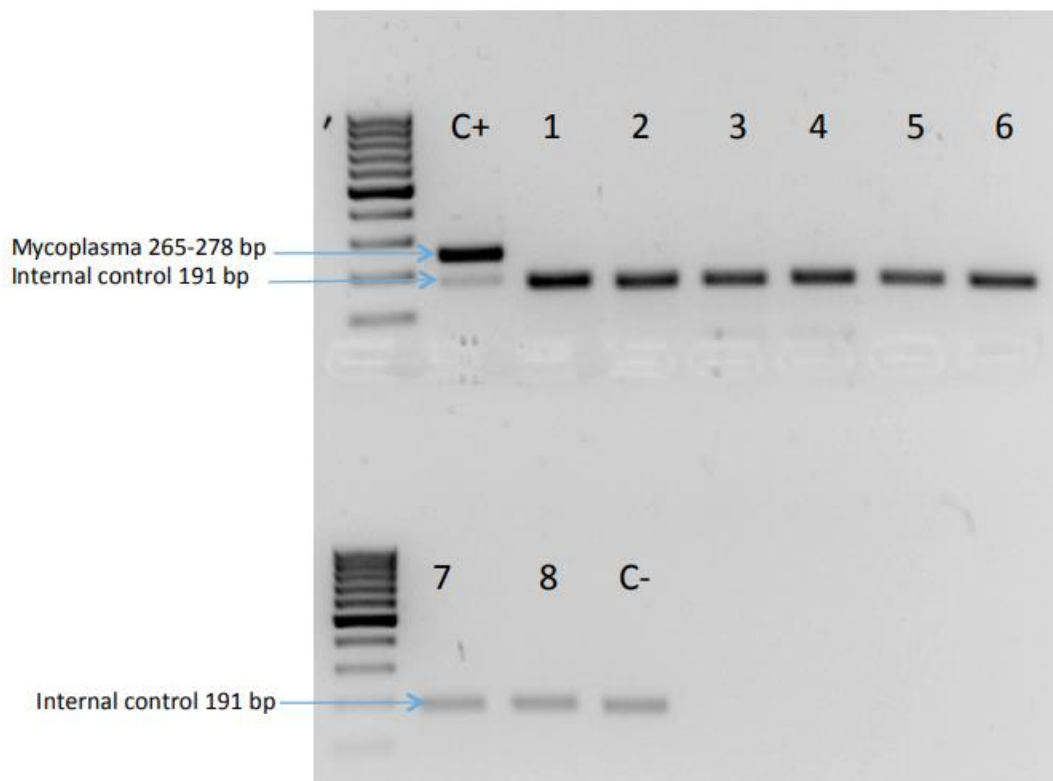


Presencia de la mutación TEFM en iPSC (iPSC TEFM corresponde a MD FiPS3304-Sv4F-5)



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