

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA

Application Form to Deposit a Human Cell Line

Documentos que se acompañan:

Attached documents:

- Copia de la autorización de derivación de la línea celular, junto con informe del Comité Ético del centro de procedencia.
A copy of the authorization for the derivation of the cell line, with the corresponding ethics committee approval
- Copia de cualquier publicación científica relacionada con la derivación y/o caracterización de la línea.
A copy of any relevant published scientific papers related to the derivation and/or characterization of the cell line
- C. V. del investigador principal (una página; formato libre).
A one page CV for the Principal Investigator
- Otros (especificar).
Others (specify)

SECCIÓN 1

Section 1

Información General

General Information

Nombre de la línea: VAL-6M

Name of the line:

Investigador principal: Carlos Simón Vallés

Principal Investigator:

Origen de la línea celular:

Origin of the cell line

Embrionario **Fetal** **Adulto**
Embryonic *Fetal* *Adult*

¿La línea celular ha sido derivada de un embrión con anomalía genética?

Has the cell line been derived from an embryo with genetic anomaly?

NO **SÍ** (especificar) Distrofia miotónica tipo 1 (Síndrome de Steinert)
No *Yes* *(specify)*

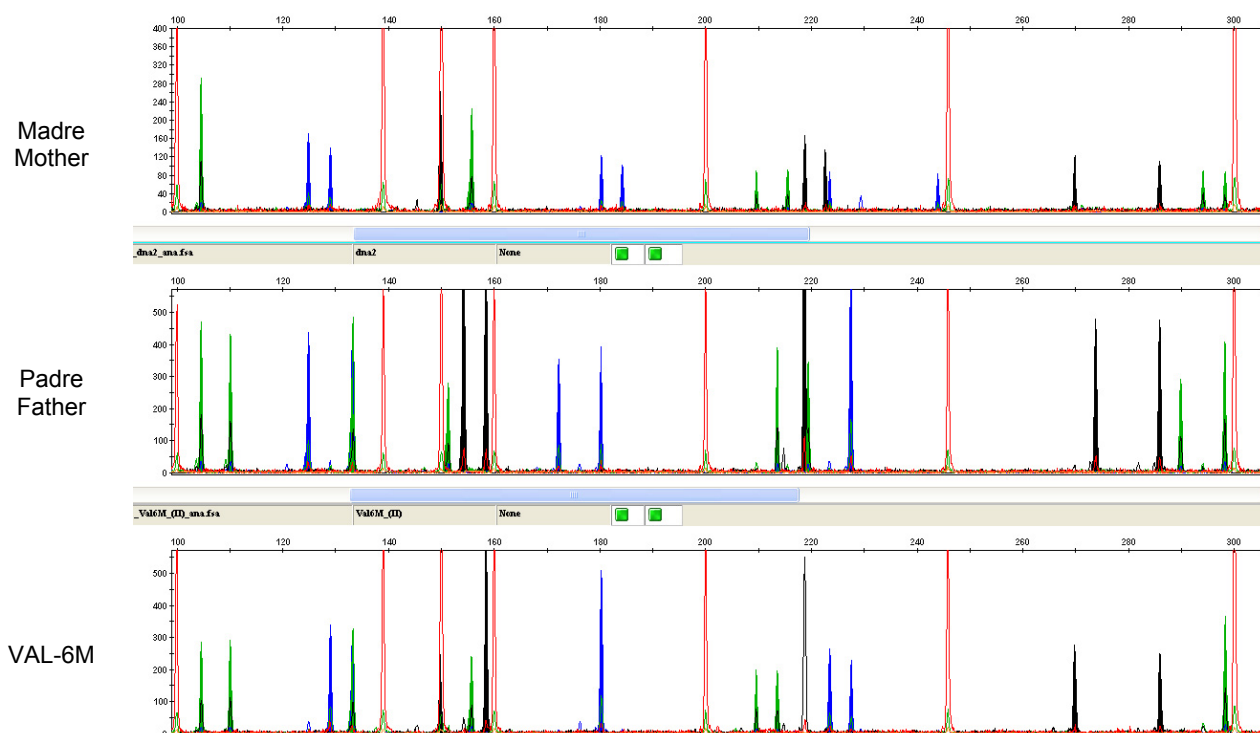
La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es una enfermedad multisistémica que afecta el esqueleto y músculo liso, ojos, corazón, sistema endocrino, y el sistema nervioso central. Es autosómica dominante y está causada por la repetición de trinucleótidos CTG en el gen DMPK (el único gen se conoce asociado a la distrofia miotónica tipo 1). A partir de 34 repeticiones se considera clínicamente anormal. Para cuantificar el número de trinucleótidos CTG se realiza el análisis por PCR para detectar ≤ 100 repeticiones y Southern blot para detectar > 100 repeticiones.

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a multisystem disorder that affects both skeletal and smooth muscle, the eye, the heart, the endocrine system, and the central nervous system. DM1 is autosomal dominant and caused by expansion of a CTG trinucleotide repeat in the gene DMPK (the only gene known to be associated with myotonic dystrophy type 1). A CTG repeat length exceeding 34 repeats is considered clinically abnormal. Testing to quantify the number of DMPK CTG trinucleotide repeats is done by PCR analysis to detect repeat sizes ≤ 100 repeats and Southern blot analysis to detect CTG expansions >100 repeats.

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado

Genetic identity of the cell line. Method and result

Fingerprinting



SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Carlos Simón Vallés	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Av. Autopista del Saler, 16
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Investigación Príncipe Felipe (C.I.P.F.)	Teléfono (phone): 963 28 96 80 Fax: 963 28 96 81 E-mail: csimon@cipf.es

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tipo de muestra biológica (especificar estadio embrionario, semanas de gestación,...) <i>Kind of biological sample (specify embryonic stage, weeks of pregnancy,...)</i> Embrión en día 6 de desarrollo (blastocisto hatching) / Embryo on day 6 of development (hatching blastocyst)	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i> <input checked="" type="checkbox"/>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> Congelación: 14-02/2007 Recepción: 20-04/2007 Freeze: 14-02/2007 Reception: 20-02/2007	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 23-04/2007
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 13-02/2007	

Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal o de tejido adulto) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample or of adult tissue)</i> Tras tratamiento hormonal, extracción de ovocitos y Fecundación In Vitro (FIV) mediante la técnica de ICSI, se obtuvieron embriones que fueron mantenidos en cultivo embrionario a 37°C y CO ₂ de 5%, hasta día 3 de desarrollo (6-8 células). En día 3 se realizó el diagnóstico genético preimplantacional (PGD) y los embriones afectados por la enfermedad monogénica fueron donados por los progenitores y vitrificados en día 6 de desarrollo. Posteriormente, fueron desvitrificados mediante un protocolo con gradientes de sacarosa. El embrión origen de la línea de células madre fue tratado con ácido Tyrodes para eliminar la zona pelúcida y se colocó sobre células humanas de Foreskin irradiadas y medio de cultivo hES y bFGF. After hormonal treatment, oocyte retrieval and In Vitro Fertilization (IVF) using ICSI technique, resulting embryos were cultured at 37°C and 5 % CO ₂ , until day 3 of development (6-8 cells) when they were subjected to PGD. Embryos affected by monogenic disease were donated by the progenitors, and vitrified on day 6. Later, they were desvitrified with the saccharose gradients protocol. The embryo employed to derivate this cell line was treated with Tyrodes Acid to remove the zona pellucida (ZP) and then plated on irradiated human Foreskin cells and hES medium plus bFGF.
--

En caso de muestra embrionaria, indicar si se utilizaron blastómeros o células de la masa celular interna y el método de aislamiento utilizado

If of embryonic origin, indicate whether blastomeres or internal cell mass were used, as well as the isolation method

Se utilizó la masa celular interna obtenida de un blastocisto completo en el cual fue retirada la zona pelúcida con ácido tyrodes.

It was used the internal cellular mass of a complete blastocyst in which was removed the zona pellucida with tyrodes acid.

Origen del soporte celular o acelular utilizado para la derivación, así como de los componentes de los medios de cultivo (si se describen en publicación, indicar además referencia)

Origin of the cellular or cellular free support used in derivation in addition to the components of the culture mediums (if they are described in a publication, please indicate the reference).

Soporte celular /cellular support : human foreskin fibroblasts (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA). N° catálogo: CRL-2429.

Componentes del medio / medium components:

DMEM high glucose (Gibco/BRL, Paisley, Scotland, UK), n° Catálogo: 41965039 ; Medium 199 (Gibco), n° catálogo: 31150022

Fetal Bovine Serum (Gibco), n° catálogo: 10091148; Fungizone (Gibco), n° catálogo: 15290034; Gentamicin (Gibco), n° catálogo: 15750-037

Valbuena D, Galán A, Sánchez E, Poo ME, Gómez E, Sánchez-Luengo S, Melguizo D, García A, Ruiz A, Moreno R, Pellicer A, Simón C. Derivation and characterization of three new Spanish human embryonic stem cell lines (VAL-3,-4,-5) on human feeder and in serum-free conditions. *Reproductive BioMedicine Online* 2006; 13(6):875-86.

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio* (1:1 - 1:2)

Método de pase: *Passage method* mecánico / mechanical

Xenobióticos
Xenobiotics

si
Yes

no
No

Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)

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)

Morfología característica de células madre: colonias aplanadas, translúcidas y con bordes definidos, con células homogéneamente dispuestas en monocapa, y ratio núcleo/citoplasma elevado. Se agrupan en colonias de 3000-5000 células.

Characteristic morphology of human embryonic stem cells: flat colonies, translucent, with defined borders, with cells homogeneously located in a monolayer, and a high ratio of nucleus/cytoplasm. Colonies with 3000-5000 cells.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

El soporte celular fue testado para: bacterias habituales, Mycoplasma, endotoxinas, citomegalovirus, Epstein-Barr, VHB, VHC, herpes humano 6(A) y 6(B), VIH1, VIH2, HTLV-I/II, parvovirus y transcriptasa reversa. Los resultados fueron negativos. Los controles fueron realizados por el Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), entidad homologada por AENOR, ENAC y Consellería de Sanitat.

La línea fue testada para patógenos habituales. De forma rutinaria se realizan controles microbiológicos que aseguran la ausencia de microorganismos en las condiciones de cultivo utilizadas.

Cellular support was tested for: usual bacteria, Mycoplasm, endotoxin, cytomegalovirus, Epstein-Barr, HBV, HCV, human herpes 6(A) y 6(B), HIV1, HIV2, HTLV-I/II, parvovirus and reverse transcriptase. Results were negative. Controls were done by the Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI), homologated by AENOR, ENAC and Consellería de Sanitat. Cell line was tested for common pathogens. Routinely, we perform microbiologic controls that ensure the absence of microorganisms in the culture conditions used.

Marcadores:*Markers*

	Método (ARN/proteínas) Method (RNA/proteins)	nº pase Passage n.	resultado results	comentarios comments
Oct 4	PCR e inmunocitoquímica (ICQ) / PCR and immunocytochemistry (ICC)	36/39	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation
Nanog	PCR e ICQ/ PCR and ICC	36/18	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation
Rex 1	PCR	36	negativo/negative	indiferenciación/indifferentiation
Sox 2	PCR	36	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation
SSEA3	-	-		
SSEA4	ICQ/ICC	18	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation
TRA-1-60	ICQ/ICC	18	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation
TRA-1-81	ICQ/ICC	18	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation
Telomerasa/Telomerase	PCR	32	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation
Fosfatasa Alk. /Alkaline phosphatase	ICQ/ICC	43	positivo/positive	indiferenciación/indifferentiation
Cariotipo / Karyotype	bandas G / G bands	19	46,XY	masculino normal/normal male
Otros / Others				
	Thy-1, Cripto, FOXD3	PCR	36	positivo/positive indiferenciación/indifferentiation
	Nfh	PCR	36	negativo/negative diferenciación /differentiation (ectodermo) / (ectoderm)
	Ren	PCR	36	negativo/negative diferenciación /differentiation (mesodermo) / (mesoderm)
	Amy	PCR	36	negativo/negative diferenciación /differentiation (endodermo) / (endoderm)

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result	marcador marker	pase passage	resultado result
In Vitro	tubulin β-III	39	positivo	α-fetoproteína	39	positivo	actina muscular	18	positivo
<i>In vitro</i>	tubulin β-III	39	positive	α-fetoprotein	39	positive	muscle actin	18	positive

In vivo/ in vivo**Método:**
*Method:*inducción de teratomas
teratomas induction**Resultado:** positivo
Result: positive

Descripción de las características de diferenciación *in vitro**Description of the differentiation characteristics in vitro*

Se sembraron colonias sobre placas recubiertas con gelatina al 1% y se dejó que diferenciaran espontáneamente durante tres semanas. Posteriormente, se fijaron las células y se realizó inmunocitoquímica para marcadores de las tres capas germinales.

Colonies were plated on 1% gelatine coated plates and left for three weeks to allow spontaneous differentiation. Afterwards, cells were fixed and immunocytochemistry was performed against the three germ layers.

Datos de la determinación de pluripotencialidad *in vivo* o formación de teratomas*Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation*

Inyección intratesticular en ratones SCID de colonias de la línea y posterior análisis morfológico de los teratomas. Obtención de tipos celulares propios de ectodermo, mesodermo y endodermo.

Cell colonies were injected into the testis of SCID mice and afterwards morphologically analyzed for teratoma formation. Typical tissues from the ectoderm, mesoderm and endoderm were obtained.

Datos de la tipificación HLA*HLA typification data*

A*02, A*24;
B*14, B*52;
Cw*02, Cw*15;
DRB1*01, DRB1*16

Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.*Cell consistency after 6 passages of freezing and thawing. Results.*

La línea celular se mantiene estable tras más de 6 pases siguiendo los procedimientos de congelación y descongelación propios.

The cell line is stable for more than 6 passages following our freezing and thawing protocol.

Valbuena D., Sánchez-Luengo S., Galán A., Sánchez E., Gómez E., Poo ME, Ruiz V, Genbacev O., Krtolica A., Pellicer A., Moreno R., Simón C. An Efficient Slow Freezing hESC Cryopreservation Method in Xeno-Free Conditions without the use of a programmable freezer. Reproductive BioMedicine Online, 2008, *in press*.

Pase en el momento del registro*Passage at the time of the recording*

Pase 46

Passage 46

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?*Has the line been genetically modified?*Sí Yes No No **Comentarios/ Comments:****¿Se llevó a cabo un análisis clonal?***Has a clonal analysis been carried out?*Sí/ Yes No **Resultado / Result**

Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):

Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

VAL-6M tiene 144 repeticiones CTG en el gen *DMPK*. *DMPK* es el único gen que se conoce asociado a la Distrofia muscular tipo 1 (DM1).

Se ha establecido una colaboración con "Istem Institute for cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases" (Francia). El objetivo global del proyecto es el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la cura de enfermedades neuromusculares. El programa de investigación se basa en el uso de líneas de células madre de embrionarias humanas líneas (hESC) que expresan una enfermedad monogénica como modelo de estudio *in vitro* de dichas enfermedades, para comprender así los mecanismos moleculares e investigar la eficacia de los tratamientos farmacológicos. En concreto, se está utilizando VAL-6M como modelo de estudio de la "Distrofia miotónica tipo 1" o "Enfermedad de Steinert".

VAL-6M has 144 repeats of the CTG trinucleotide repeat in the *DMPK gene* (>50 CTG repeats). *DMPK* is the only gene known to be associated with myotonic dystrophy type 1 (DM1).

Collaboration has been established with "Istem cell Therapy and Institute for Exploration of Monogenic diseases" (France). The overall objective of the project is to develop new therapeutic strategies to advance towards a cure for neuromuscular diseases. The research programme is based on the use of stem cell lines of human embryonic lines (hESC) expressing a monogenic disease as a model for in vitro study of such diseases to understand the molecular mechanisms and to investigate the efficiency of drug treatments. Specifically, VAL-6M will be used as a model for studying "Myotonic Dystrophy type 1" or "Steinert disease."

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 4

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> Rubén Moreno Palanques Fecha/ Date: 21/02/2008	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i> Carlos Simón Vallés Fecha /Date 21/02/2008
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Rubén Moreno Palanques. Director General.	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Centro de Investigación Príncipe Felipe. Av. Autopista del Saler, 16-3 46012 Valencia	Teléfono /Telephone: 963 28 96 80 Fax: 963 28 97 01 E-mail: rmorenop@cipf.es