

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)
National Bank of Stem Cell Lines
IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA EMBRIONARIA-FETAL
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

La autorización de la derivación no aplica, se adjunta informe del Comité Etico del proyecto de investigación.

Authorization for the derivation of the cell line does not applied. Attached is ethics committee approval for the project.

- 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)

- | | |
|----------------|---|
| Anexo-1 | Tipado HLA y microsatelites
<i>HLA and STR analysis</i> |
| Anexo 2 | Morfología
<i>Morfology</i> |
| Anexo 3 | Analysis de micoplasma
<i>Mycoplasma testing</i> |
| Anexo 4 | Cariotipo (Bandeo G)
<i>Karyotype G-Banding anlysis</i> |
| Anexo 5 | Caracterización fenotípica
<i>Immunophenotypic characterization</i> |
| Anexo 6 | Factores de transcripción
<i>Expression of transcription factors</i> |
| Anexo 7 | Diferenciación <i>in vitro</i>
<i>In vitro differentiation</i> |
| Anexo 8 | Diferenciación <i>in vivo</i>
<i>In vivo differentiation</i> |
| Anexo 9 | Copia de la publicación
<i>Copy of the manuscript</i> |

SECCIÓN 1
Section 1

Información General
General Information

Nombre de la línea: AND1-FLT3 D835
Name of the line:

Investigador principal: PABLO MENENDEZ BUJAN / CLARA BUENO UROZ
Principal Investigator:

Origen de la línea celular:
Origin of the cell line

Embrionario **Fetal**
Embryonic *Fetal*

¿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)
No *Yes* *(specify)*

Identificación genética de la línea celular. Método y resultado
Genetic identity of the cell line. Method and result

Análisis de Microsatélites (ver Anexo-1)
Microsatellite characterization (see Annex 1)

Cariotipo / Karyotype **46,XY, +i(7)p(11),-7**

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Pablo Menéndez Buján Clara Bueno Uroz	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda de la Ilustración 114 Granada 18016
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Fundación Publica Progreso y Salud-GENYO	Teléfono (phone): 958715500 Fax: 958637071 E-mail: pablo.menendez@genyo.es clara.bueno@genyo.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> Modificación genética de la línea AND1, desarrollada previamente por el BACM en Granada <i>Genetic modification from AND1, previously developed by the BACM in Granada</i> <input checked="" type="checkbox"/>	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> <div style="text-align: right;"> Fresco <input type="checkbox"/> Crioconservado <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i> </div>	
Fecha de la obtención del muestra biológica <i>Date of obtaining the biological sample</i> Junio 2011 <i>June 2011</i>	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> Junio 2011 <i>June 2011</i>
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i>	
Descripción general del procesamiento previo del muestra biológica utilizado (cultivo embrionario, procesamiento muestra fetal, ...) <i>General description of the processing of the biological sample used (embryonic culture, processing of fetal sample, ...)</i> <p>La Línea AND1 fue obtenida del BNLC tras la aprobación del comité pertinente para la ejecución del proyecto <i>Desarrollo de un modelo de leukemia linfoblástica infantil proB con translocación MLLAF4 basado en el uso de células madre embrionarias humanas y de cordón umbilical</i>. Las células fueron cultivadas tal y como se describe en la bibliografía.</p> <p><i>AND1 cell line was obtained from the BNLC after the approval by the corresponding ethic committee for the execution of the project entitled: Development of a model for acute lymphoblastic leukemia proB MLLAF4 based on the use of hESCs and umbilical cord blood. Cells were cultured as described in the bibliography.</i></p>	

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 línea AND1 generada previamente por el BACM como se describe en Cortes JL *et al* . Human Reprod 2009; 24: 1844.

AND1 cell line was generated by the BACM as described in Cortes JL et al . Human Reprod 2009; 24: 1844.

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).

Medio de cultivo:

1.- Cuando las células crecen sobre hMSCs como soporte celular: Knock-out DMEM, 20% Suero de reemplazo, 1% aminoácidos no esenciales, 1% glutamina, 0.1 mM 2-mercaptoetanol, 4ng/mL bFGF

When growing onto hMSCs: Knock-out DMEM, 20% serum replacement, 1% non-essential aminoacids, 1% L-glutamine, 0.1mM 2-mercaptoethanol, 4 ng/ml bFGF.

2.- Cuando se cultivan sobre matrigel: mismo medio pero condicionado por hMSCs + 4ng/ml bFGF

When growing onto matrigel: same media but conditioned by hMSCs +4ng/ml bFGF

Mantenimiento de la línea: Line maintenance

Ratio de pase: *Passage ratio*

Método de pase: *Passage method*

Ratio de pase: 1:2-1:3 cada 7-9 días

Pass ratio: 1:2-1:3 every 7-9 days

Xenobióticos

Xenobiotics

si (matrigel puede tener trazas de componentes animales)

Yes (matrigel may have traces of xenobiotics)

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)

Colonias redondeadas y células con elevada relación núcleo/citoplasma

Rounded colonies. High nucleus/cytoplasm ratio

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Micoplasma: PCR Negativo

Mycoplasma: by PCR Negative

Marcadores: <i>Markers</i>				
	Método (ARN/proteínas) <i>Method</i> <i>(RNA/proteins)</i>	nº pase <i>Passage n.</i>	resultado <i>results</i>	comentarios <i>comments</i>
Oct 4	CITOMETRIA	40	+	
Nanog	RT-PCR	40	+	
Rex 1	RT-PCR	40	+	
Sox 2	RT-PCR	40	+	
SSEA3	CITOMETRIA	40	+	
SSEA4	CITOMETRIA	40	+	
TRA-1-60	CITOMETRIA	40	+	
TRA-1-81	CITOMETRIA	40	+	
Telomerasa/Telomerase (opcional/optional)				
Fosfatasa Alk. /Alkaline phosphatase				
Otros / Others				

Capacidad de diferenciación <i>Differentiation capacity</i>									
	Ectodermo/ Ectoderm			Endodermo/Endoderm			Mesodermo/ Mesoderm		
	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>	marcador <i>marker</i>	pase <i>passage</i>	resultado <i>result</i>
In Vitro							CD34	40-60	+
							CD45	40-60	+
							CD31	40-60	+
In vivo/ in vivo	Método: <i>Method:</i>	Formación de teratoma <i>Teratoma formation</i>				Resultado: <i>Result:</i>	Ectodermo/Ectoderm + Endodermo/Endoderm + Mesodermo/Mesoderm +		

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

Las células se han diferenciado a tejido hematopoyético mediante la formación de cuerpos embrionarios, medio de diferenciación y citocinas hematopoyéticas como se describe en Blood 2013; 121:3867

The cells were differentiated into hematopoietic tissue through the formation of embryoid bodies supplemented with hematopoietic cytokines as describe in Blood 2013; 121:3867

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

Las células se inyectan en la cápsula testicular o subcutáneamente en el flanco de un ratón NOD/SCID como se describe en Stem Cells 2011; 29:251

Cells are injected into testicular capsule or subcutaneously into flank of a NOD/SCID mouse as described in Stem Cells 2011; 29:251

Datos de la tipificación HLA*HLA typification data. Ver anexo 1 / see annex 1***Consistencia celular tras 6 pases de congelación y descongelación. Resultados.***Cell consistency alter 6 passages of freezing and thawing. Results.*

Las células se han congelado y descongelado en >10 ocasiones manteniendo la viabilidad .

Cells have gone through multiple (>10) freeze-thaw procedures and they remain viable.

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

AND1 FLT3 D835 p60

¿Ha sido la línea modificada genéticamente?*Has the line been genetically modified?*Sí Yes No No **Comentarios/ Comments:**

Se uso el lentivirus pRRL-EF1 α -FLT3 D835-PGK-GFP
A pRRL-EF1 α -FLT3 D835-PGK-GFP lentivector was used.

¿Se llevó a cabo un análisis clonal?*Has a clonal analysis been carried out?*Sí/ Yes No **Resultado / Result**

Paucilonal.

Otras observaciones o información relevantes (a juicio del Investigador Principal):
Other observations or relevant information (to the discretion of the Principal Investigator):

Esta línea muestra una gran capacidad de diferenciación hematopoyética

This hESC line displayed a great hematopoietic potential

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.

<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:</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p>  <p>Fecha /Date 02/07/2013</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i></p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i></p>	<p>Teléfono /Telephone:</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail:</p>

CURRICULUM VITAEJuly 6th, 2013

PERSONAL INFORMATION:

NAME: Pablo MENENDEZ (November 16th, 1974)
CURRENT POSITION: ICREA Research Professor.
 Scientific Director Institute Josep Carreras-Campus Clinic.
CONTACT INFO: Phone: 00 34 655010572; E-mail: pmenendez@carrerasresearch.org

EDUCATION & TRAINING:

1992-1997	B. Sc. (Biochemistry)	University of Salamanca. Spain.
1997-2002	Ph.D. (Medicine)	University of Salamanca. Spain.
2002-2005	Post-doctoral fellow in Dr. Mick Bhatia's Lab. Stem Cell Biology Program, Roberts Research Institute, University of Western Ontario, London, ON, Canada.	
2005-2007	Jose Carreras Trust Fellow. Section of Hemato-Oncology headed by Prof. Mel Greaves. Institute of Cancer Research, London, UK.	
Jan 2007-July 2011	Scientific Director BACM, Granada, Spain	
Sept 2008-April 2010	Executive MBA by IIST Bussines School	
July 2011-July 2013	Principal Investigator at GENYO: Centre for Genomics and Oncology. University of Granada	
July 2013-Present	ICREA Research Professor at Josep Carreras Leukemia Research Institute	

AWARDS, FELLOWSHIPS AND PROFESSIONAL APPOINTMENTS:

1998	DAKO studentship	
1998-2002	Graduate Ph.D. scholarship, Health Ministry of Spain (FIS scholarship).	
2002-2004	Robarts postdoctoral fellowship.	
2003	International Stem Cell Conference Travel Award. Singapore.October 2003.	
2004-2007	Canadian Institutes of Health Research (CIHR) postdoctoral fellowship Funding Reference Number: MFE-68579.	
2005	Ramón y Cajal Programme Investigator (Spanish Ministry of Science and Technology). Area of Medicine.	
2006	Personal Award "International Foundation Jose Carreras /E.D.Thomas". Reference Number FIJC-05/EDTHOMAS.	
2006	Tenure Principal Investigator. Area of Regenerative Medicine and Cell Therapy. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Spain.	
2007	Scientific Director of the Andalusian Stem Cell Bank, Deputy Director of Spanish National Stem Cell Bank.	
2008	"Tercer Milenio" Award to under 35 Young Outstanding Investigator. Promoted and funded by The Innovation, Science and Enterprise Andalusian Government.	
2010	"Conde Cartagena" Prize awarded by The Royal National Medicine Academy Prize	

PUBLICATIONS:

International peer-review publications: 100 (including Nature, Cell Stem Cell, Nat Methods, Immunity, JEM, Blood, Cancer Res, Leukemia, Stem Cells, Oncogene, Mol Cell Biol, Mol Ther, Cell Res, FASEB J, etc)

National invited publications: 5

Book Chapter: 6

H-Factor: 30

Number of times cited: 3080

ORAL LECTURES AS INVITED SPEAKER

National: 47

International: 16

PATENTS: 8 national; 1 international

PhD DISSERTATIONS: 5 defended + 1 ongoing.

OTHERS:

-Ad hoc peer-reviewer for international scientific Journals including Nature Rev Cancer, PNAS, Blood, J Cell Sci, Cancer Res, Stem Cells, Stem Cells & Dev, J Mol Cell Med, FEBS Lett, Haematologica, Human Reproduction, etc.

-Ad hoc peer-reviewer for international scientific Funding Grants including SCL (Switzerland), FANR (France), FPS (Poland), BBSRC (UK), ANEP/FIS/MICINN/AECC (Spain), Instituto de Ciencia y Tecnología de Mexico, etc.

-Member of several Scientific Advisory Boards and International Initiatives.

Clara Bueno PhD

Current Position: Miguel servet Investigator at GENyO. Centre for Genomics and Oncology: Pfizer-University of Granada-Junta de Andalucía. Granada. Spain

- Education and Training

07/2011-present	Junior Investigator at GENyO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government.
02/2007-02/2008	Josep Carreras Trust Fellow . Andalusian Stem Cell Bank. University of Granada.
01/2006-02/2007	Post-doctoral fellow. Section of Hemato-Oncology headed by Prof. Mel Greaves . Institute of Cancer Research, London, UK.
01/2003-12/2005	Post-doctoral fellow in Dr. Quim Madrenas´ Lab . Immunology Department, University of Western Ontario, London, ON, Canada.
09/1997-12/2002	Ph.D. (Medicine-HematoOncology). Salamanca University. Spain.
09/1992-09/1997	B. Sc. (Biology). Salamanca University. Spain.

- Awards and Fellowships

2011	Programa Ramón y Cajal (MICINN Spanish Ministry of Innovation).Ref. RYC-2011-08353
2008	Programa Miguel Servet (FIS. Spanish Ministry of Health). Ref.CP07/00059
2007	International Foundation Jose Carreras/E.D.Thomas Award.
2005	Juan de la Cierva Programme Investigator (Spanish Ministry of Science and Technology)
2001	Scholarship, Fondos FEDER, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain.
1998	PhD scholarship Dirección General de Universidades e Investigación, Consejería de Educación y Cultura, Junta de Castilla y León; Valladolid, Spain

- Scientific Production [*H-factor=18; Sum of citations=700*]

Nº of publications: 57 including in Immunity (1), J Exp Med (1), Blood (2), Leukemia (5), NAR, J Immunol, E J Immunol, Cell Res, Haematological, etc).

- Intellectual Property:

1.-Inventors: Pablo Menéndez, Mario Delgado, René Rodríguez, Ruth Rubio, Verónica Ramos, Clara Bueno.

Reference Number: **P201030645** / Date: April 30th 2010

2.-Inventors: Pablo Menéndez, Verónica Ramos, Clara Bueno, Pedro Real, Gertrudis Ligeró, Laura Sánchez,

Reference Number: **P0201030512** / Date: April 8th 2010

- Thesis Dissertation

On going : Cristina Prieto

2013: Rosa Montes

- 10 major publications (* indicates corresponding author)

1. **C. Bueno***, V Ayllón, R Montes; V Ramos-Mejía; P Real; M Aráuzo-Bravo; P Menendez*. FLT3 activation cooperates with MLL-AF4 fusion protein to abrogate the hematopoietic specification of hESCs. *Blood (in press)*. **IF: 9.9**
2. **C. Bueno***, R. Montes, L. Sánchez, G. Ligeró, I. Gutiérrez-Aranda, V. Ramos-Mejía, P. Real, A. Fernandez, MF. Fraga, I. Moreno, D. Burks, MC. Plaza, M. Greaves, J.C. Rodríguez-Manzanique, P. Menéndez*. "A human ESC model for MLL-AF4 reveals an impaired early hemato-endothelial specification" *Cell Research 2012; 22:986-1002*. **IF: 9.4**
3. R. Montes, V. Ayllón, I. Gutiérrez-Aranda, I. Prat, M.C. Hernández-Lamas, L. Ponce, S. Bresolin, G. te Kronnie, M. Greaves, **C. Bueno***, P. Menéndez*. "Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and progenitor potential but is not sufficient leukomogenesis". *Blood 2011; 117: 4746-4758*. **IF: 10.5**

4. MC. Chillón, M. Gómez-Casares, CE. López-Jorge, C. Rodríguez-Medina, A. Molines, ME. Sarasquete, M. Alcoceba, JD. González-San Miguel, C. **Bueno**, R. Montes, F. Ramos, JN. Rodríguez, P. Giraldo, M. Ramírez, R. García-Delgado, JL. Fuster, M. González-Díaz and P. Menéndez. Prognostic significance of FLT3 mutational status and expression levels in MLL-AF4 and MLL-germline Acute Lymphoblastic Leukemia . *Leukemia* 2012; 26: 2360-6. I.F: 9.5
5. *C. **Bueno**, RM. Montes, P. Catalina, R. Rodriguez, *P. Menendez. Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B Acute Lymphoblastic Leukemia with MLLAF4 rearrangement. *Leukemia* 2011; 25:400-410.
6. *C. **Bueno**, RM Montes, *P. Menéndez. The ROCK Inhibitor Y-27632 Negatively Affects the Expansion/Survival of Both Fresh and Cryopreserved Cord Blood-Derived CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells : Y-27632 negatively affects the expansion/survival of CD34+HSPCs. *Stem Cell Rev* 2010; 6:215-223. IF: 5.1
7. P. Menendez, P. Catalina, R. Rodriguez, G. Melen, C. **Bueno**, M. Arriero, F. García-Sánchez, A. Lassaleta, J. García-Castro*. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from infant MLL-AF4+ leukemia harbour and express the MLL-AF4 fusion gene. *J. Exp. Med* 2009; 206: 3131-41 IF: 14.5
8. AM. Ford, C. Palmi, C. **Bueno**, D. Hong, D. Knight, P. Cardus, G. Cazzaniga, T. Enver, M. Greaves: TEL-AML1 dysregulates the TGFβ pathway: A basis for pre-leukemic stem cell selection. *J Clin Invest* 2009; 119:826-836 IF:15.3
9. C. **Bueno***, P. Catalina, GJ Melen, RM. Montes, L. Sánchez, G. Ligeró, P. Menendez. Etoposide Etoposide Induces MLL Rearrangements and other chromosomal abnormalities in hESCs. *Carcinogenesis* 2009; 30:1628-37. IF: 4.9
10. C. **Bueno***, R. Montes, L.- Martin, A. Orfao, P. Menendez. NG2 antigen is expressed in CD34+ HPCs and plasmacytoid dendritic cell-precursors: Is NG2 expression in leukemia dependent on the target cell where leukemogenesis is triggered?. *Leukemia* 2008; 22: 1475-78 IF: 9.5
11. TW Small, C **Bueno**, J Madrenas, JG Pikerling. Wilms' tumour 1-Associating Protein is essential for maintaining vascular smooth muscle cell quiescence. *Circulation Research* 2006; 99: 1338-1346 IF: 9.4
12. AK Rahmann, CA Herfst, B moza, LA Chau, C **Bueno**, J Madrenas, EJ Sundberg, JK McCormick. Molecular basis of T cell receptor selectivity, cross-reactivity and allelic discrimination by a bacterial superantigen: Integrative functional and energetic mapping of the SpeC-Vβ2.1 molecular interface. *Journal of Immunology* 2006; 177:8595-8603 IF: 6.4
13. C **Bueno**, G Criado, M L Baroja, S S G Ferguson, N Rahmann, C Tsoukas and J Madrenas. Bacterial superantigens bypass early Lck-dependent TCR signaling pathway by activating a Gα11-dependent PLC-β-mediated signaling pathway. *Immunity* 2006; 25(1): 67-78 IF: 20.5

Highlighted in:

Sci. STKE (This Week in ST, published 1 August 2006), <http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans:2006/346/tw254>.

Reviewed in:

Faculty in 1000 biology: Brigitte Huber: 5 Sep 2006 <http://www.f1000biology.com/articule/id/1033930/evaluation> Steve Ward: 25 Aug 2006 <http://www.f1000biology.com/articule/id/1033930/evaluation> Zamosyka: Superantigens: Supersignalers? *SciSTKE*.2006; 358:45.

14. C. **Bueno**, J. Almeida, D. Suarez Vilela, F. Ramos, P. Lucio, A. Parreira, J.M. De Pablos, F. Ruiz-Cabello, J. Marco, R. Garcia, J.F. San Miguel, A. Orfao. Incidence and characteristics of CD4+/HLA DR^{hi} dendritic cell malignances. *Haematologica* 2004; 89(1): 58-69 IF: 6.5
15. P. Menéndez, F. Proper, C. **Bueno**, C. Arbona, JF. San Miguel, J. García-Conde, C. Solá, J. Hornedo, H. Cortés-Funes, A. Orfao. Sequential analysis of CD34⁺ and CD34⁻ cell subsets in peripheral blood and

leukapheresis products from breast cancer patients mobilized with SCF plus G-CSF and cyclophosphamide. *Leukemia* 2001; 15: 430-439. IF: 9.5

- **Current funding**

Title	Funding Agency	Role	Amount €	Duration
Infant MLL-AF4+ pro-B Acute Lymphoblastic Leukemia: towards the elucidation of the cellular and molecular mechanisms underlying MLL-AF4-mediated transformation in human stem cells	Spanish Ministry of Health-ISCIII	Principal Researcher	180.000	2012-2014
Infant MLL-AF4+ pro-B Acute Lymphoblastic Leukemia: towards the elucidation of the cellular and molecular mechanisms underlying MLL-AF4 transformation in human stem cells	Spanish Association Against Cancer	Collaborator	150.000	2011-2013

JUNTA DE ANDALUCÍA

S A L I D A	JUNTA DE ANDALUCÍA CONSEJERÍA DE SALUD
	06 OCT. 2011
	Registro General 36 601 / 37.468 Sevilla

Ref: CCM/CRY/ 562

Nº de Expediente: PRE11-03

5 de octubre de 2011

Rdo: Resolución de Autorización Proyecto de Investigación

CONSEJERÍA DE SALUD

Dirección General de Calidad, Investigación y Gestión del Conocimiento

FUNDACION PUBLICA ANDALUZA

PROGRESO Y SALUD

JUAN JESÚS BANDERA GONZÁLEZ

Av. Américo Vespucio, 5, bloque 2, 2ª planta

41.092-SEVILLA

R E C E P C I O N	JUNTA DE ANDALUCÍA CONSEJERÍA DE SALUD Dirección General de Calidad, Investigación y Gestión del Conocimiento
	13/10/2011
	2275 Sevilla

Vista la solicitud de autorización del proyecto de investigación titulado: "Mecanismos celulares y moleculares responsables de la leucemia linfoblástica aguda del lactante con reordenamiento MLL-AF4" que presenta D. Juan Jesús Bandera González, se contemplan los siguientes

ANTECEDENTES DE HECHO

PRIMERO: Con fecha de entrada en la Consejería de Salud de 20 de abril de 2.011, D. Juan Jesús Bandera González, con D.N.I. nº 25.099.902-W, en nombre y representación de la entidad "FUNDACION PUBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD", con C.I.F. nº G-41825811, presenta solicitud para la autorización del proyecto de investigación titulado " Mecanismos celulares y moleculares responsables de la leucemia linfoblástica aguda del lactante con reordenamiento MLL-AF4", del que es investigadora principal la Dra. Clara Bueno Uroz, con DNI nº 13160044L; al amparo del Decreto 364/2003, de 22 de diciembre, por el que se regula la organización, composición y funcionamiento del Comité de Investigación con Preembriones Humanos y el procedimiento de autorización de los proyectos y centros de investigación con preembriones sobrantes de las técnicas de fecundación in Vitro.

El proyecto se desarrollará en el Banco Andaluz de Células Madre.

SEGUNDO: De acuerdo a criterios científicos objetivos, el proyecto se somete a la valoración independiente de dos evaluadores, elegidos por el Comité de Investigación con Preembriones Humanos, que emiten informes favorables a la autorización del proyecto.

TERCERO: La Comisión Autónoma de Ética e Investigación Sanitarias de Andalucía informa favorablemente el proyecto, de acuerdo al artículo 2.5 de la ley 7/2003, de 20 de octubre, por la que se regula la investigación en Andalucía con preembriones humanos no viables para la fecundación in vitro.

CUARTO: Con fecha 18 de julio de 2.011, se reúne la Comisión de Seguimiento y Control de la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos, emitiendo informe favorable sobre el citado proyecto.



QUINTO: El Comité de Investigación con Preembriones Humanos, con fecha 3 de octubre de 2011, acuerda informar favorablemente la autorización del proyecto

FUNDAMENTOS DE DERECHO

PRIMERO: Según lo dispuesto en el artículo 2.3 de la ley 7/2003, de 20 de octubre, por la que se regula la investigación en Andalucía con preembriones humanos no viables para la fecundación in vitro, y de acuerdo con lo establecido en el artículo 2.a) del Decreto 364/2003, de 22 de diciembre, por el que se regula la organización, composición y funcionamiento del Comité de Investigación con Preembriones Humanos y el procedimiento de autorización de los proyectos y centros de investigación con preembriones sobrantes de las técnicas de fecundación in Vitro, la competencia para autorizar corresponde al Comité de Investigación con Preembriones Humanos, como órgano colegiado adscrito a la Consejería de Salud.

SEGUNDO: El artículo 35 de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, establece que requerirán el informe previo favorable de la Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos, los proyectos de investigación que versen en todo o en parte sobre las siguientes materias: a) La investigación con preembriones humanos, b) La investigación con células troncales embrionarias humanas. c) La activación de ovocitos mediante transferencia nuclear para su uso con fines terapéuticos o de investigación. d) Cualquier otra técnica que, utilizando en todo o en parte muestras biológicas de origen humano, pueda dar lugar a la obtención de células troncales, e) la investigación con células o tejidos embrionarios obtenidos por cualquiera de los procedimientos señalados en el art. 33.2, f) Cualquier otra línea de investigación que incluya material celular de origen embrionario humano u otro funcionalmente semejante, y g) La investigación con líneas de células troncales embrionarias que provengan de otro país, intracomunitario o extracomunitario.

TERCERO: En el Artículo 37 de la citada Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, se crea la Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos, como el órgano colegiado, adscrito al Instituto de Salud Carlos III, entre cuyas funciones figuran a) Asegurar las garantías científicas, éticas y legales que sean exigibles en relación con las investigaciones indicadas en el artículo 35 y c) Emitir informe preceptivo sobre proyectos de investigación que requieran la entrada y/o salida de material embrionario.

CUARTO: En el art. 3 del Real Decreto 1527/2010, de 15 de noviembre, por el que se regulan la Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos y el Registro de Proyectos de Investigación; se asignan una serie de funciones a esta Comisión entre las que se encuentra la de emitir informe previo favorable sobre los proyectos de investigación y actividades que se indican en el artículo 6 de ese real decreto.



Vistos los preceptos legales citados y demás de general aplicación, este Comité de Investigación con Preembriones Humanos

RESUELVE

CONCEDER LA AUTORIZACION para desarrollo del proyecto de investigación titulado: "Mecanismos celulares y moleculares responsables de la leucemia linfoblástica aguda del lactante con reordenamiento MLL-AF4", del que es investigadora principal la Dra. Clara Bueno Uroz, de acuerdo a los fundamentos de derecho expuestos y en las siguientes condiciones:

- 1º. El proyecto se desarrollará en el Banco Andaluz de Células Madre.
- 2º. La vigencia de autorización de esta resolución se establece por un periodo de tres años, a contar desde la fecha de recepción de la misma.
- 3º. Podrá solicitarse la renovación de esta autorización al Comité de Investigación con Preembriones Humanos, en los términos previstos en el artículo 9. del Decreto 364/2003, de 22 de diciembre.
- 4º. Cualquier modificación de las condiciones en que inicialmente fue autorizado el proyecto de investigación requerirá una nueva autorización del Comité de Investigación con Preembriones Humanos, de acuerdo con lo establecido en el art. 8 del Decreto 364/2003, de 22 de diciembre.
- 5º. El incumplimiento de las condiciones de autorización o de los restantes requisitos establecidos en la normativa aplicable, determinará la revocación o suspensión de la autorización concedida.
- 6º. Con periodicidad anual la investigadora principal del proyecto, deberá presentar al Comité de Investigación con Preembriones Humanos, una memoria del estado de las investigaciones. Asimismo, deberá informar, de cualquier presentación de sus resultados en reuniones o publicaciones de carácter científico. Todo ello sin perjuicio de la información que le requiera el Comité.
- 7º. Una vez finalizado el proyecto de investigación, en el plazo máximo de seis meses, la investigadora principal presentará al Comité de Investigación con Preembriones Humanos, la memoria científica del proyecto, con indicación de los resultados obtenidos, publicaciones científicas y perspectivas de utilización futura para la mejora de la salud y la calidad de vida de las personas.



8º. La investigadora principal tiene la obligatoriedad de depositar en el Banco Nacional de Líneas Celulares una muestra de las líneas celulares que puedan obtenerse en el desarrollo del proyecto mencionado; para su almacenaje y cesión a cualquier investigador que lo solicite a través de los cauces legales establecidos, siempre dentro del marco de la legislación vigente en dicho momento.

Esta Resolución no pone fin a la vía administrativa, y contra ella podrá interponerse recurso de alzada, ante la Secretaría General de Calidad y Modernización de la Consejería de Salud, en el plazo de un mes desde su notificación, de conformidad con lo establecido en los artículos 114 y 115 de la Ley 30/92 (en la redacción dada por la Ley 4/1999 de 13 de enero), de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común.

Sevilla a 5 de octubre de 2.011

LA PRESIDENTA DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
CON PREEMBRIONES HUMANOS



Fdo: Carmen Cortes Martínez



S A L I D A	JUNTA DE ANDALUCÍA CONSEJERÍA DE SALUD
	31 MAR. 2009
	Registro General 36 9.959 Sevilla

FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD
Sr. D. Juan Jesús Bandera González
Avda. de Américo Vespucio, 5 Bloq. 2-2ª Plta.
ISLA DE LA CARTUJA
41092 SEVILLA

CCM/RCG/CRY/evv S-744
Sevilla, 30 de marzo de 2009
Remitiendo resolución corregida
autorización modificaciones

R E C E P C I O N	JUNTA DE ANDALUCÍA CONSEJERÍA DE SALUD Fundación Progreso y Salud	
	08/04/09	
	Registro General 0897 Sevilla	Hora

Habiéndose detectado un error en la Resolución del Comité de Investigación con Preembriones Humanos emitida el 23 de marzo de 2009, en referencia a la fecha de ampliación de la autorización del proyecto "Desarrollo de un modelo de leucemia linfoblástica infantil pro-B con translocación MII-Af4 basado en el uso de células madre embrionarias humanas y de cordón umbilical", se envía la Resolución modificada, ampliándose el plazo de autorización del proyecto hasta el 26 de julio de 2011.

LA SECRETARIA DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
CON PREEMBRIONES HUMANOS




Fdº: Consuelo Rello Yubero

S A L I D A	JUNTA DE ANDALUCÍA CONSEJERÍA DE SALUD
	31 MAR. 2009
	Registro General 36 Sevilla

Con fecha 4 de marzo de 2009 ha tenido entrada en el Registro General de la Consejería de Salud, escrito dirigido a la Presidenta del Comité de Investigación con Preembriones Humanos, referente al proyecto titulado "**Desarrollo de un modelo de leucemia linfoblástica infantil pro-B con translocación MII-Af4 basado en el uso de células madre embrionarias humanas y de cordón umbilical**", autorizado por este Comité el 26 de julio de 2007, en el que el investigador principal, D. Pablo Menéndez Buján, solicita:

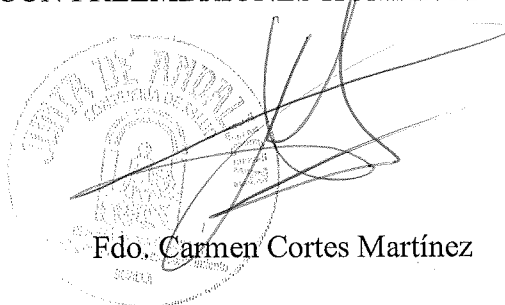
- La ampliación del plazo de autorización, motivada por la posibilidad de utilización de nuevas líneas celulares, por la inclusión de un nuevo objetivo dentro del proyecto y por otras cuestiones tanto de carácter científico como de tipo organizacional.
- La incorporación de Dña. Verónica Ramos Mejía al equipo investigador de este proyecto, como experta en el campo de células madre humanas de origen embrionario y hematopoyesis, lo que facilitará la consecución de los objetivos inicialmente planteados.

Este Comité, en base a las atribuciones que le confiere el Decreto 364/2003, de 22 de diciembre, por el que se regula la organización, composición y funcionamiento del Comité de Investigación con Preembriones Humanos y el procedimiento de autorización de los proyectos y centros, y lo estipulado en el art. 8 de ese Decreto sobre modificación de las condiciones de autorización, **RESUELVE**:

- la ampliación del plazo de autorización del proyecto "Desarrollo de un modelo de leucemia linfoblástica infantil pro-B con translocación MII-Af4 basado en el uso de células madre embrionarias humanas y de cordón umbilical", durante 2 años más (hasta el 26 de julio de 2011)
- informar favorablemente la incorporación de Dña. Verónica Ramos Mejía al equipo investigador del proyecto.

Sevilla a 30 de marzo de 2009.

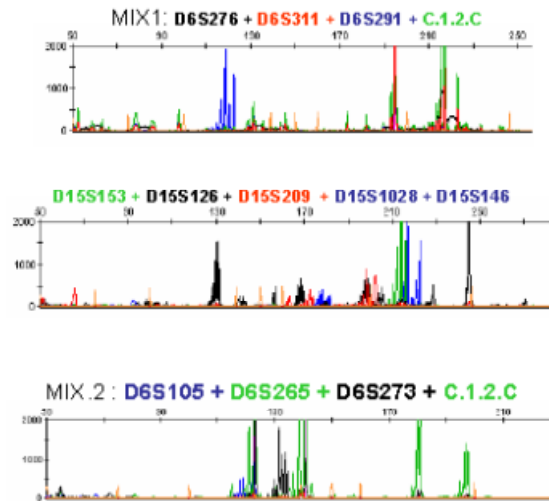
LA PRESIDENTA DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
CON PREEMBRIONES HUMANOS



Fdo. Carmen Cortes Martínez

ANEXO-1 Tipado HLA y microsatélites

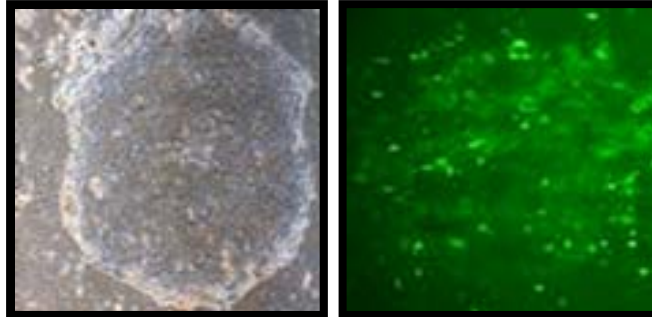
HLA and STR analysis



ANEXO-2

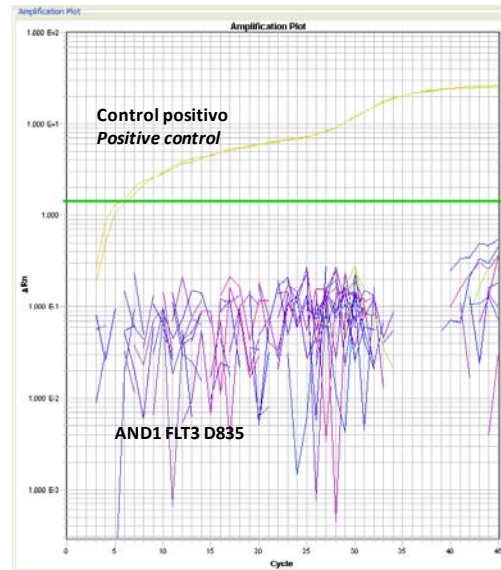
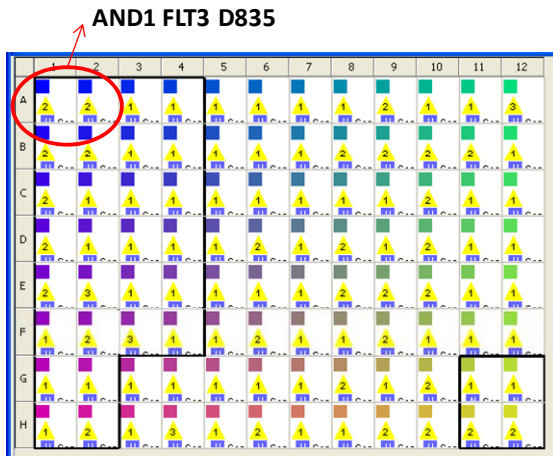
Morfología

Morphology



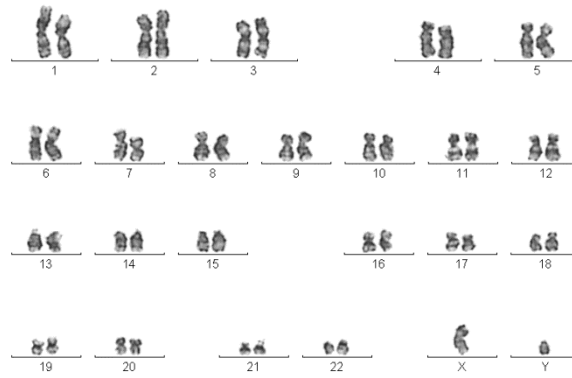
ANEXO-3 Análisis de micoplasma

Mycoplasma Analysis



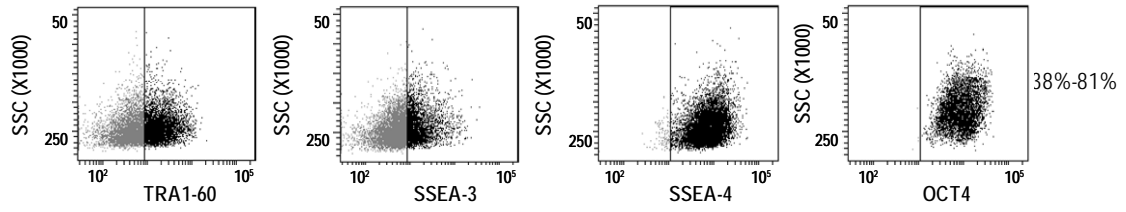
ANEXO-4 Análisis de cariotipo (Bandeo G)

Karyotype G-Banding analysis



ANEXO-5 Caracterización Immunofenotípica

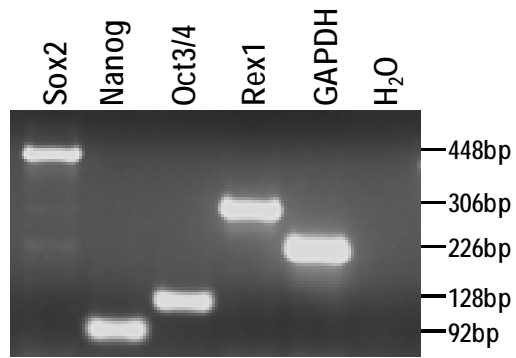
Immunophenotypic characterization



ANEXO-6

Factores de Transcripción

Expression of transcription factors

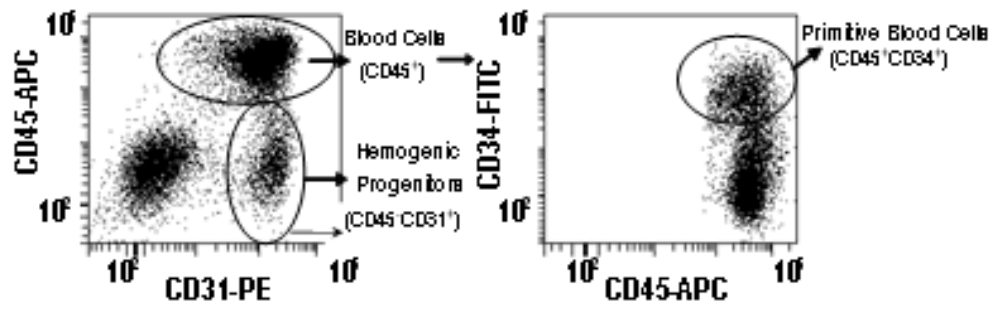


ANEXO-7 Diferenciación *in vitro*

In vitro differentiation

Diferenciación a tejido sanguíneo:

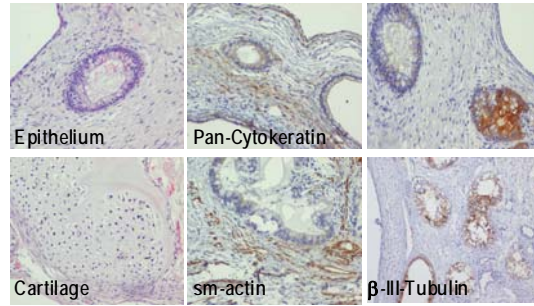
Hematopoietic differentiation:



ANEXO-8

Diferenciación *in vivo*

In vivo differentiation



Regular Article

LYMPHOID NEOPLASIA

FLT3 activation cooperates with MLL-AF4 fusion protein to abrogate the hematopoietic specification of human ESCs

Cara Bueno,¹ Verónica Aylón,¹ Rosa Montes,¹ César Navarro Montero,¹ Verónica Ramos Mejía,¹ Pedro J. Real,¹ Camià Romero Noya,¹ Marcos J. Aradizo Bravo,² and Pablo Menéndez^{1,3,4}

¹Genira for Genomics and Oncological Processes, Pfizer, University of Granada/Andalusian Regional Government, Granada, Spain; ²Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Department of Cell and Developmental Biology, Laboratory of Computational Biology and Bioinformatics, Münster, Germany; ³Josip Carreras Leukemia Research Institute, Facultat de Medicina, University of Barcelona, Spain; ⁴Instituto Galego de Pesquisa e Estudos Avançados (IGPEA), Breogana, Spain

Key Points

- FLT3 activation cooperates with the MLL-AF4 fusion gene to fully abolish blood formation from hESCs.
- FLT3 activation does not cooperate with the MLL-AF4 fusion oncogene to transform hESCs or hESC-derived hematopoietic progeny.

Mixed-lineage leukemia (MLL)-AF4 fusion arises prenatally in high-risk infant acute pro-B lymphoblastic leukemia (pro-B-ALL). In human embryonic stem cells (hESCs), MLL-AF4 skewed hematopoietic specification but was insufficient for transformation, suggesting that additional oncogenic insults seem required for MLL-AF4-mediated transformation. MLL-AF4+ pro-B-ALL expresses enormous levels of FLT3, occasionally because of activating mutations, thus representing a candidate cooperating event in MLL-AF4+ pro-B-ALL. Here, we explored the developmental impact of FLT3 activation alone, or together with MLL-AF4, in the hematopoietic fate of hESCs. FLT3 activation does not affect specification of hemogenic precursors but significantly enhances the formation of CD45+ blood cells, and CD45+CD34+ blood progenitors with clonogenic potential. However, overexpression of FLT3 mutations or wild-type FLT3 (FLT3-WT) completely abrogates hematopoietic differentiation from MLL-AF4-expressing hESCs, indicating that FLT3 activation cooperates with MLL-AF4 to inhibit human embryonic hematopoiesis. Cell cycle/apoptosis analyses suggest that FLT3 activation directly affects hESC specification rather than proliferation or survival of hESC-emerging hematopoietic derivatives. Transcriptional profiling of hESC-derived CD45+ cells supports the FLT3-mediated inhibition of hematopoiesis in MLL-AF4-expressing hESCs, which is associated with large transcriptional changes and downregulation of genes involved in hematopoietic system development and function. Importantly, FLT3 activation does not cooperate with MLL-AF4 to immortalize/transform hESC-derived hematopoietic cells, suggesting the need of alternative (epi-)genetic cooperating hits. (Blood 2013;00:00:00-00)

Introduction

Newborn cancer is progressively seen as a developmental biology disease.¹ An intriguing newborn cancer is the infant pro-B immunocyte acute lymphoblastic leukemia (ALL) characterized by the hallmark genetic abnormality t(4,11) encoding the fusion mixed-lineage leukemia (MLL)-AF4, which is associated with a dismal prognosis and very brief latency, raising the question of how this disease evolves so quickly.^{2,4} Compelling evidence indicates that MLL-AF4 acts prenatally during embryonic/fetal hematopoiesis.^{5,6} To understand the developmental impact of MLL-AF4, we first need to elucidate which is the target cell for transformation and the mechanisms underlying MLL-AF4-mediated transformation.

MLL-AF4-induced leukemogenesis has been difficult to model, and bona fide MLL-AF4 disease models do not exist.⁷⁻¹⁰ Our understanding of MLL fusions comes from mouse models, which do not recapitulate the human disease faithfully, suggesting that these mouse models may be missing essential components of leukemogenesis during early human development. It could be

argued that the lack of an MLL-AF4 model may be because (i) a cell in a wrong developmental stage was targeted in the mouse, (ii) the impact of other secondary hits has not been properly addressed, (iii) MLL-AF4 requires the reciprocal AF4-MLL fusion protein to cause pro-B ALL as shown in the mouse, and (iv) MLL-AF4 exerts its transforming function preferentially in human cells, indicating that the MLL-AF4 function has to be addressed using ontogenically permissive human stem cells. Among these, neonatal (cord blood [CB]-derived) CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) or prenatal (fetal- or embryonic-derived) cells represent ontogenically early candidate target cells. Thus, human embryonic stem cell (hESC)-derived hematopoietic differentiation constitutes a robust human-specific strategy to study the onset of hematopoiesis, representing a promising tool for modeling developmental mechanisms of human disease and lineage specification that cannot be addressed with patient samples or mouse models.^{11,12}

Submitted November 27, 2012; accepted February 27, 2013. Prepublished online as Blood First Edition paper, March 11, 2013; DOI 10.1182/blood-2012-11-470146.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with IBCR uniform article 1734.

© 2013 by The American Society of Hematology