

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

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

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

FECHA: 18 septiembre 2020

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 Ético 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** PR 01-2015

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 iPS <i>Name of the iPS line:</i>	cPRPF31-MiPS4F7
Nº de registro en el Human Pluripotent Stem Cell Registry (1)	ESi0078-A
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>	Monocitos (PBMCs) de sangre periférica obtenida por venopunción. (Peripheral blood monocytes (PBMCs) obtained by venopuncture)
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre (male) 43
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input checked="" type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) Control sano de retinosis pigmentaria debida a mutación en PRPRF31. Healthy control for PRPF31-retinitis pigmentosa. <i>No Yes (specify)</i>
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input type="checkbox"/> (especificar) <i>No Yes (specify)</i>

<i>genetic origin?</i>	
Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> <i>Fresh</i> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 22 Diciembre 2017	Fecha del uso o descongelación (<i>si congelado</i>) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 27 Diciembre 2017
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	Los monocitos purificados de la muestra de sangre se matuvieron durante una semana en cultivo en suspensión en medio EM en un incubador estándar. Purified PBMCs were cultured for a week in a standard incubator in suspension in EM medium EM: QBSF-60 Stem Cell (Quality Biological) with 50 µg/ml of ascorbic acid (Sigma-Aldrich); 50 ng/ml of SCF (Stemcell Technologies); 10 ng/ml IL-3 (Stemcell Technologies); 2 U/mL of EPO (Stemcell Technologies); 40 ng/ml IGF-1 (Stemcell Technologies); 1 µM Dexamethasone (Sigma-Aldrich) and 1% Pen/strep (Gibco)
Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de las células de origen <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the original cells.</i>	Se realizó el análisis de huella genética por STR (10 marcadores), hallándose identidad entre la muestra de ADN genómico procedente de las células primarias y la obtenida a partir de las células iPS. Dato en Anexo 3 Identity between primary cells and derives iPS was checked by STR analysis of genomic DNA using 10 loci. Data in Anexo 3
¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase? <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	No
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>	Transducción de factores de Yamanaka (hOCT3/4, hSOX2, hc-MYC, and hKLF4), mediante virus no integrativo (Sendai virus). The reprogramming factors hOCT3/4, hSOX2, hc-MYC, and hKLF4 were transduced into the primary PBMCs via the non-integrative Sendai virus.
Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia) <i>iPS Culture conditions (if they are described in a publication, please indicate the reference)</i>	Las células iPS se mantuvieron inicialmente en cultivo sobre feeders (fibroblastos humanos irradiados ref. ATCC CRL2429) en medio hESC completo y en un incubador estándar con pase manual una vez por semana a un ratio 1:3. Posteriormente, las células iPS se adaptaron a cultivo sobre matrigel sin feeders, en medio mTeSR™1 (STEMCELL) con pase mediante dispasa una vez por semana en ratio 1:10. Esta es la condición de las células congeladas para banqueo. The iPS cells were maintained on feeders (human fetal foreskin fibroblasts (ATCC CRL2429) inactivated by 45Gy irradiation), with mechanical passage once a week and 1:3 split ratio. Later, cells were adapted to grow without feeders, on matrigel and mTeSR1 medium with weekly passage at 1:10 split ratio. Frozen vials for biobank were cells grown on this conditions.

	<p>hESC medium: Knock Out DMEM-F12 (Gibco); 20% Knock Out serum (Gibco); 1% glutamine (Gibco); 1% nonessential amino acids (Gibco); 0.23 mM β-mercaptoethanol (Gibco); 1% pen-strep (Gibco) and 10 ng/ul bFGF (Peprotech)</p> <p>(Reference: Ana B. García Delgado, Berta de la Cerda, Julia Alba Amador, M. Lourdes Valdés Sánchez, Beatriz Fernández-Muñoz, Isabel Relimpio López, Enrique Rodríguez de la Rúa, Andrea Díez Lloret, Sofía M. Calado, Rosario Sánchez Pernaute, Shom S. Bhattacharya, Francisco J. Díaz Corrales. Subretinal transplant of iPSC-derived retinal pigment epithelium on nanostructured fibrin-agarose. Tissue engineering-A. 2019 May;25(9-10):799-808. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0007)</p>
<p>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros) <i>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)</i></p>	<p>El cultivo sobre feeders tiene la siguiente morfología: Colonias aplanadas de tamaño medio, forma poligonal, bordes bien diferenciados y un ratio elevado nucleo/citoplasma. El cultivo sobre matrigel tiene una morfología de colonias planas redondas de bordes bien diferenciados.</p> <p>On feeders, the morphology is: Regular-sized flat polygonal-shaped colonies with refractive edges and high nuclear/cytoplasmic ratio. Without feeders, cells grow as flat colonies with neat borders and round shape.</p>
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Cada criovial corresponde a las células de un pocillo de placa de 6-well de iPS adaptadas a cultivo sin feeders en medio mTeSR1 sobre matrigel. Las células se suspendieron en 1 mL de solución de congelación: 60% mTeSR1, 30% knockout serum (KSR) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). Inmediatamente se congelaron a una velocidad de enfriamiento lenta en un contenedor de isopropanol durante 24 h a -80°C y posteriormente se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.</p> <p>Each cryovial corresponds to the cells of a well of iPS 6-well plate adapted to grow without feeders in mTeSR1 medium on matrigel. The cells were suspended in 1 mL of freezing solution: 60% mTeSR1, 30% knockout serum (KSR) and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). They were immediately frozen at a slow cooling rate in an isopropanol container for 24 h at -80 °C and subsequently stored in a liquid nitrogen tank.</p>
<p>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15) <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>15</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i> Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>

SECCIÓN 2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA iPS.
Adjuntar resultados (imágenes o gráficos) como anexo

Section 2 iPS Cell Line characterization results. Attach results (images and graphics) as an annex

<p>Test de pluripotencia <i>Pluripotency test</i></p>	<p>Método <i>Method</i></p>		<p>Nº pase <i>Passage n.</i></p>	<p>Resultado <i>Results</i></p>	<p>Comentarios <i>Comments</i></p>	
	Oct 4	IF	13	+	see anexo 5	
	Nanog	IF	13	+		
	Sox 2	IF	13	+		
	SSEA3	IF	13	+		
	SSEA4	IF	13	+		
	TRA-1-60	IF	13	+		
	TRA-1-81	IF	14	+		
	Fosfatasa. Alk	AP assay kit	14	+		
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p>	<p>Comentarios <i>Comments</i></p>	<p>Método <i>Method</i></p>	<p>Marcador <i>Marker</i></p>	<p>Nº pase <i>Passage n</i></p>	<p>Resultado <i>Results</i></p>	<p><i>Comments</i></p>
	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	IF	TUJ1; PAX6	13	+	see anexo 8
	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	IF	SMA; Desmin	13	+	
	Endoderm <i>Endoderm</i>	IF	AFP; FOXA2	13	+	
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i></p> <p><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i></p>	<p>Se generaron cuerpos embrioides mediante el cultivo de colonias iPS en condiciones no adherentes en medio hESC sin bFGF durante 7 días. Posteriormente se pasaron los cuerpos embrioides a condiciones adherentes sobre gelatina con medio de cultivo DMEM/F12 +2 mM glutamina + 10% de FBS (suero fetal bovino) y se cultivaronn otros siete días. La diferenciación espontánea a los tres linajes se verificó por inmunofluorescencia.</p> <p>Embryoid bodies (EBs) were generated in non-adherent culture conditions, hESC-bFGF for 7 days. EBs were then cultured in adherent conditions on gelatin and 10% FBS supplemented DMEM/F12+ 2mM glutamine culture media. Spontaneous differentiation to the three lineages was assessed by immunofluorescence.</p>					

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Método <i>Method</i></th> <th>Marcador <i>Marker</i></th> <th>Nº pase <i>Passage n</i></th> <th>Resultado <i>Results</i></th> <th>Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td>IF</td> <td>TUBB3</td> <td>9</td> <td>+</td> <td>see anexo 6, 7</td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>IF</td> <td>SMA</td> <td>9</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td>IF</td> <td>AFP</td> <td>9</td> <td>+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>	IF	TUBB3	9	+	see anexo 6, 7	Mesodermo <i>Mesoderm</i>	IF	SMA	9	+		Endodermo <i>Endoderm</i>	IF	AFP	9	+	
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																				
Ectodermo <i>Ectoderm</i>	IF	TUBB3	9	+	see anexo 6, 7																				
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	IF	SMA	9	+																					
Endodermo <i>Endoderm</i>	IF	AFP	9	+																					
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>	<p>iPS de dos pocillos de una placa de 6-well y se suspendieron en 50 microlitros de matrigel. La mezcla se administró subcutáneamente en dos sitios de inyección de un ratón inmunodeprimido. Después de 8 semanas se recogieron los teratomas y se prepararon para análisis histológico. Se realizó inmunofluorescencia para marcadores de las tres capas embrionarias. iPS picked from 2 wells of a 6-well plate were suspended in 50 microliters of matrigel. The mixture was administered subcutaneously at two injection sites of an immunosuppressed mouse. After 8 weeks the teratomas were harvested and prepared for histological analysis by immunofluorescence for three embryonic layers</p>																								
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica en el pase de banco) <i>Karyotype (Specify karyotype formula in the passage in which it is banked)</i></p>	<p>46 X, Y See anexo 2</p>																								
<p>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular <i>Cell Identity: Genetic fingerprinting by microsatellite analysis / STR of the cell line</i></p>	<p>cMiPS4F (See anexo 3)</p> <table border="1"> <tbody> <tr><td>AMEL</td><td>X,Y</td></tr> <tr><td>CSF1PO</td><td>8, 11</td></tr> <tr><td>D5S818</td><td>11</td></tr> <tr><td>D13S317</td><td>8, 11</td></tr> <tr><td>D21S11</td><td>30, 33.2</td></tr> <tr><td>D16S539</td><td>9, 13</td></tr> <tr><td>D7S820</td><td>9, 11</td></tr> <tr><td>TH01</td><td>7, 9.3</td></tr> <tr><td>TPOX</td><td>8, 11</td></tr> <tr><td>vWA</td><td>16, 18</td></tr> </tbody> </table>	AMEL	X,Y	CSF1PO	8, 11	D5S818	11	D13S317	8, 11	D21S11	30, 33.2	D16S539	9, 13	D7S820	9, 11	TH01	7, 9.3	TPOX	8, 11	vWA	16, 18				
AMEL	X,Y																								
CSF1PO	8, 11																								
D5S818	11																								
D13S317	8, 11																								
D21S11	30, 33.2																								
D16S539	9, 13																								
D7S820	9, 11																								
TH01	7, 9.3																								
TPOX	8, 11																								
vWA	16, 18																								
<p>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>La reprogramación se realizó por transducción de los factores de Yamanaka en los PBMCs mediante un virus de RNA no integrativo (Sendai virus, Cytotune sendai reprogramming kit, Life Technologies).</p> <p>A non-integrative approach was used for the reprogramming of the cell line. Yamanaka factors were transduced into PBMCs by the non-integrative RNA Sendai virus (Cytotune sendai reprogramming kit, Life technologies).</p>																								

<p>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Se ha comprobado la ausencia de Sendai virus del genoma de las células mediante RT-PCR de los factores exógenos de reprogramación y del gen que codifica para la cápside del virus (SeV).</p> <p>Clearance of sendai virus from the cells was checked by rt-PCR for the reprogramming transgenes and the capsid gene (SeV).</p> <p>See anexo 4</p>
<p>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética <i>Confirmation of genotypic diagnosis of the cell line generated from samples with genetic mutation</i></p>	<p>La muestra corresponde a un control sano de retinosis pigmentaria. Es un individuo de una familia con una mutación identificada como causante de la enfermedad, por lo que se realizó la secuenciación de la región genómica que rodea a la mutación, con el resultado de secuencia silvestre en homocigosis.</p> <p>Cell line is derived from a sample of a healthy donor. Donor is a member of a family in which retinosis pigmentaria has been identified. Sanger sequencing of the genomic region surrounding the mutation present in the family was performed finding a homozygous wt sequence.</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Test de micoplasma por PCR con resultado negativo.</p> <p>Negative micoplasm PCR detection.</p> <p>See anexo 9</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Francisco J. DíazCorrales</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Americo Vespucio 49, 41092 Sevilla, España</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> CABIMER</p>	<p>Teléfono (phone): 954467425</p> <p>Fax:</p> <p>E-mail: francisco.diaz@cabimer.es</p>

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):

Esta línea se generó para el estudio de retinosis pigmentaria causada por mutaciones en el gen PRPF31. La reprogramación y caracterización se llevó a cabo en CABIMER por la Dra Berta de la Cerda Haynes.

The cell line was generated for the study of PRPF31-linked retinosis pigmentaria. Reprogramming and characterization were performed in CABIMER by Dr. Berta de la Cerda Haynes



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 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 (Representante legal del Departamento/Centro) Legal Representative of the Department/Centre  Fecha / Date:	Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator  18/09/2020. Fecha /Date
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Name and Position of the Person Representing the Centre: DIRECTOR GERENTE	GONZALO BALBONTÍN CASILLAS
Dirección Postal: Postal Address:	Teléfono /Telephone: Fax: E-mail:

(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:
- http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/Nomenclatura_iPS_BNLC_2015.pdf