

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES (TRONCALES)

National Bank of Stem Cell Lines

IMPRESO DE SOLICITUD DE DEPÓSITO DE UNA LÍNEA iPS

Application Form to Deposit an iPS cell line of human origin

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). Anexos 1-5
Others (specify) Annexes 1-5

SECCIÓN 1 *Section 1*

Información General *General Information*

Nombre de la línea: iPS0989#2f
Name of the line: iPS0989#2f

Investigador principal: Ángel Raya, Adolfo López de Munain
Principal Investigator: Ángel Raya, Adolfo López de Munain

Tipo de célula de la que se obtiene la línea: Fibroblastos epidérmicos
Cell type origin of the cell line: Epidermal fibroblasts

¿El sujeto fuente tiene alguna patología?
Has the donor any pathological condition?

NO **SÍ** (especificar) Distrofia de Cinturas de tipo 2A (LGMD2A)
No *Yes (specify) Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2A (LGMD2A)*

¿La patología es de origen genético?
Is the pathological condition of genetic origin?

NO **SÍ** (especificar) CAPN3 exon22 AG-TCATCT en homocigosis
No *Yes (specify) Homozygous for CAPN3 exon22 AG-TCATCT*

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

Cariotipo/Karyotype

Euploide/Euploid **Anormal/Atypical** (especificar/specify) 46, XX

SECCIÓN 2
Section 2

Datos del Depositante
Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Angel Raya	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona.
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC)	Teléfono (phone): 93 402 0537 Fax: 93 402 0183 E-mail: araya@ibecbarcelona.eu

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Adolfo López de Munain	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avenida Dr. Begiristain s/n, 20014 San Sebastián.
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia.	Teléfono (phone): 943 006 294 Fax: 943 006 250 E-mail: adolfojose.lopezdemunainarregui@osakidetza.net

SECCIÓN 3
Section 3

Datos de la Línea Celular
Details of Cell Line

Tejido de origen y localización anatómica de la muestra biológica <i>Tissue of origin and anatomic location of the biological sample</i> Biopsia de piel de espalda Skin biopsy from the back	
Muestra biológica <i>Biological sample</i> Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>	
Fecha de la donación del muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 22 May, 2014	Fecha del uso o descongelación (si congelado) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 22 May, 2014

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).

Raya A et al. Nature protocols 2010; 5(4): 647-60

Mantenimiento de la línea: Line maintenance en HFF/on HFF

Ratio de pase: *Passage ratio 1:2 – 1:4*

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)

Colonias grandes poligonales, de 1-3 mm de diámetro, de diversas formas y con bordes lisos y bien definidos. Células de tamaño uniforme y un elevado ratio núcleo/citoplasma.

Large polygonal colonies of 1-3mm of diameter, several shapes and well-defined edges. Uniformly sized cells with high nucleus/cytoplasm ratio.

Controles microbiológicos realizados (indicar detalladamente)

Microbiological controls carried out (indicate in detail)

Bacteriología
(Bacteriology)

Micología
(Mycology)

Micoplasma: PCR
(Mycoplasma: by PCR)

Marcadores: ver Anexo 1*Markers: See Annex 1*

	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	inmunofluorescencia	6	+	
Nanog	inmunofluorescencia	6	+	
Rex 1	q-RT-PCR	6	+	
Sox 2	inmunofluorescencia	6	+	
SSEA3	inmunofluorescencia	6	+	
SSEA4	inmunofluorescencia	6	+	
TRA-1-60	inmunofluorescencia	6	+	
TRA-1-81	inmunofluorescencia	6	+	
Telomerasa/Telomerase	-			
Fosfatasa Alc.	Actividad	4	+	
Otros / Others				

Capacidad de diferenciación*Differentiation capacity*

	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 <i>Anexo 3</i>	TUJ1	10	+	FoxoA2	10	+	SMA	10	+
In vitro <i>Annex 3</i>	GFAP	10	+	α-fetoprotein	10	+	Gata4	10	+
In vivo/ in vivo	Método: <i>Method:</i>						Resultado: <i>Result:</i>		

OPCIONAL/OPTIONAL:**Reprogramación del perfil de expresión génica (ver anexo 4)***Reprogramming of gene expression profile (see Annex 4)***Reprogramación del perfil de metilación del ADN (ver anexo 4)***Reprogramming of DNA methylation profile (see Annex 4)***Longitud telomérica***Telomere length*

<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i></p> <p>Mesodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico. Endodermo: cultivo de cuerpos embrioides. Ectodermo: cultivo de cuerpos embrioides en medio N2/B27 (ver Anexo 3) Mesoderm: Embryoid bodies cultured in culture médium supplemented with ascorbic acid. Endoderm: Embryoid bodies culture. Ectoderm: Embryoid bodies cultured in N2B27 medium (see Annex 3).</p>
<p>Datos de la determinación de pluripotencialidad <i>in vivo</i> o formación de teratomas <i>Data of the pluripotentiality determination in vivo or teratoma formation</i></p>
<p>Datos de la tipificación HLA <i>HLA typification data</i></p>
<p>Integración de los transgenes de reprogramación: por southern blot (ver anexo 5) <i>Integration of reprogramming transgenes: southern blot (see annex 5)</i></p>
<p>Silenciamiento de los transgenes de reprogramación: RT-PCR o Q-RT-PCR (Anexo 5) Positivo <i>Silencing of reprogramming transgenes: RT-PCR o Q-RT-PCR (Annex 5) Positive</i></p>
<p>Mantenimiento a largo plazo en cultivo: > 20 pases <i>Long-term maintenance in culture:>20 passages</i></p>
<p>Pase en el momento del registro Pase 12 <i>Passage at the time of the recording Passage 12</i></p>

<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i></p> <p>Sí Yes <input type="checkbox"/> No No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Comentarios/ Comments:</p>	<p>¿Se llevó a cabo un análisis clonal? <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p>Sí/ Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Resultado / Result</p>
---	---

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)



Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):
Follow up of the line (to be completed by BNLC)


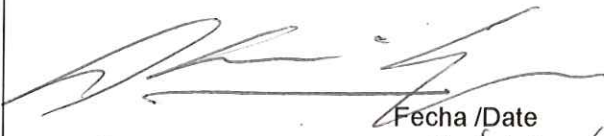
SECCIÓN 4

Declaración

Confirmo que la información contenida en estos impresos es cierta y asumo total responsabilidad sobre la misma.

I confirm that the information contained in this form is true and I assume total responsibility for it.

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)</p>  <p>Institut de bioenginyeria de Catalunya Josep Samitier / Director Fecha / Date: 22/11/2015</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha / Date 5/01/2015</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: JOSEP SAMITIER MARTI Name and Position of the Person Representing the Centre: DIRECTOR</p>	
<p>Dirección Postal: Postal Address: INSTITUT BIOCENGINYERIA DE CATALUNYA Baldià Reixac 10-12 08028 Barcelona</p>	<p>Teléfono / Telephone: +34 (93) 403 9706 Fax: (93) 403 9702 E-mail: jsamitier@ibebarcelona.eu</p>

<p>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre (Representante legal del Departamento/Centro) (Legal Representative of the Department/Centre)</p>  <p>asociación Biodonostia Pº Dr. Beguiristain, s/n 20014 Donostia-San Sebastián CIF: G-75020313 Fecha / Date: 10 diciembre 2014</p>	<p>Firma del Investigador Principal Signature of the Principal Investigator</p>  <p>Fecha / Date 10 Diciembre 2014</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: Director Científico del IIS Biodonostia Name and Position of the Person Representing the Centre: JULIO ARRIZABILLAGA AGUIRREA ZALDEGI</p>	
<p>Dirección Postal: Postal Address: INSTITUTO BIODONOSTIA P/ DOCTOR BEGIRISTAIN S/N 20014 DONOSTIA - SAN SEBASTIÁN GIPUZKOA.</p>	<p>Teléfono / Telephone: 943 00 6012 Fax: 943 00 6250 E-mail: direccion@biodonostia.org.</p>

**ANEXOS A LA SOLICITUD DE DEPÓSITO DE LA LÍNEA CELULAR iPS0989#2f
EN EL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES.**

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia iPS0989#2f

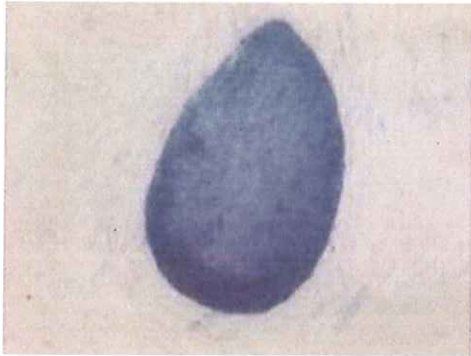
Anexo 2: Cariotipo iPS0989#2f

Anexo 3: Diferenciación *in vitro* iPS0989#2f

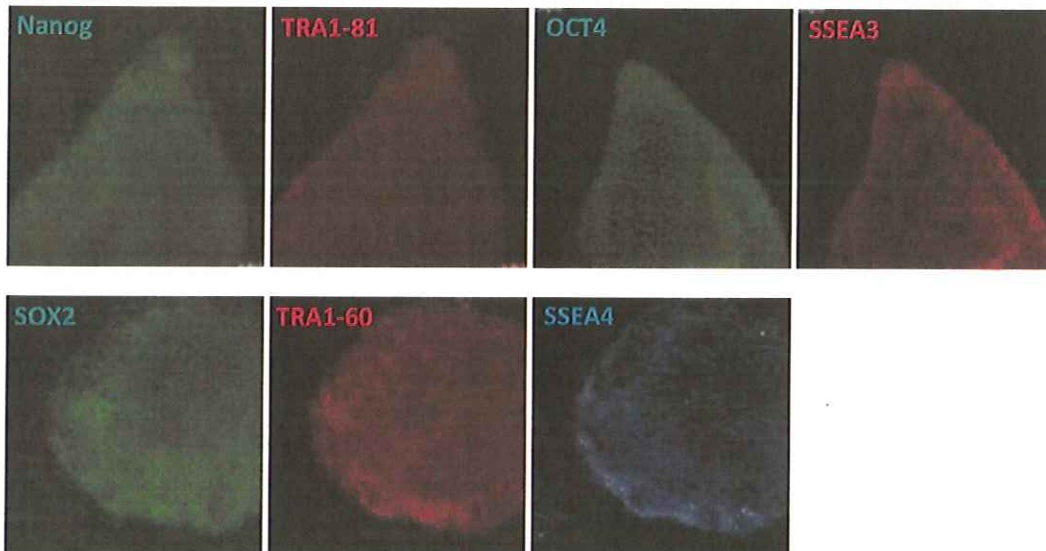
Anexo 4: Reprogramación del perfil de expresión génica y del perfil de metilación del DNA iPS0989#2f

Anexo 5: Integración de los transgenes de reprogramación y silenciamiento de los transgenes de reprogramación iPS0989#2f

Anexo 1: Fenotipo. Marcadores de pluripotencia iPS0989#2f



Actividad fosfatasa alcalina de la línea de células madre pluripotentes iPS0989#2f

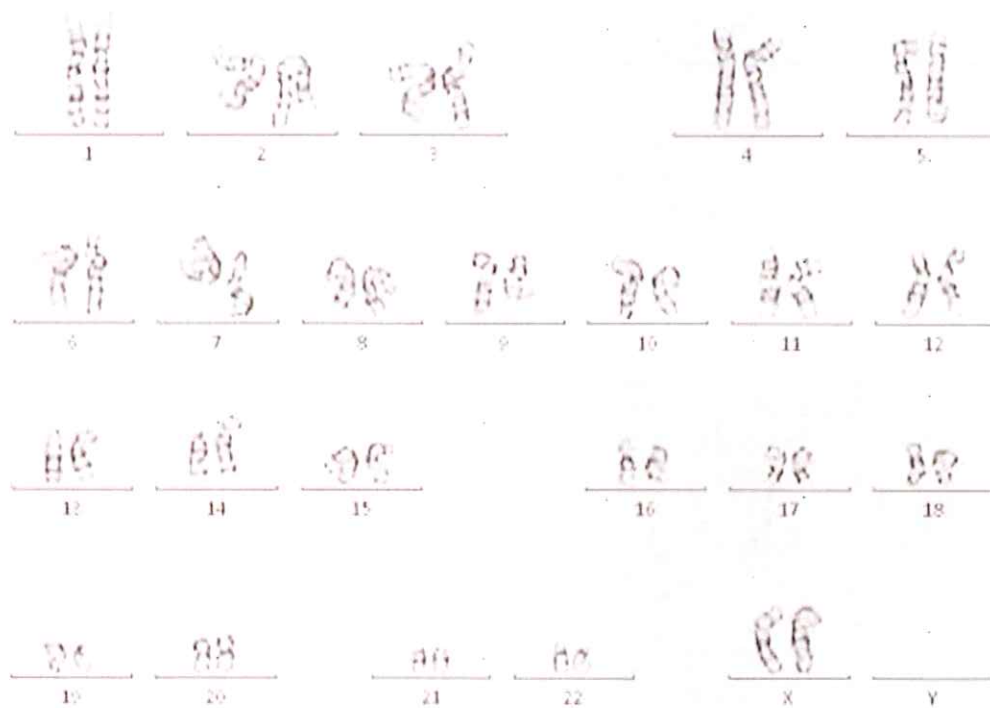


Inmunoreactividad de la línea de células madre pluripotentes iPS0989#2f para Nanog, TRA1-80, Oct4, SSEA3, Sox2, TRA1-60 y SSEA4.

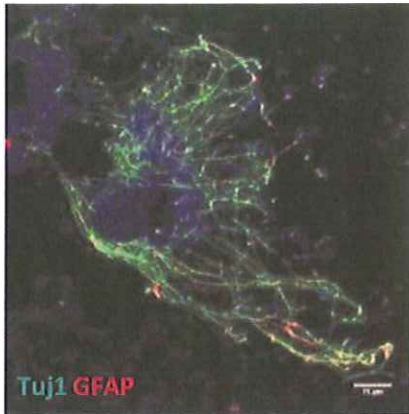
Anexo 2: Cariotipo iPS0989#2f

Nombre de la muestra: iPS0989#2f

Resultado: 46, XX



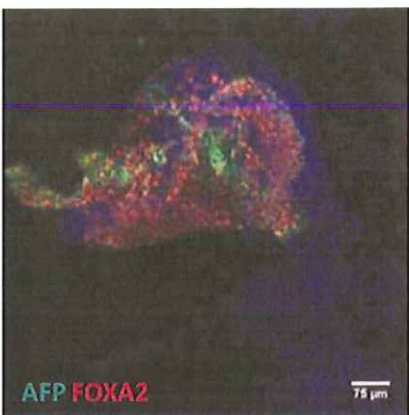
Anexo 3: Diferenciación *in vitro* iPS0989#2f



Diferenciación *in vitro* a ectodermo: Células positivas para TuJ1 y GFAP.

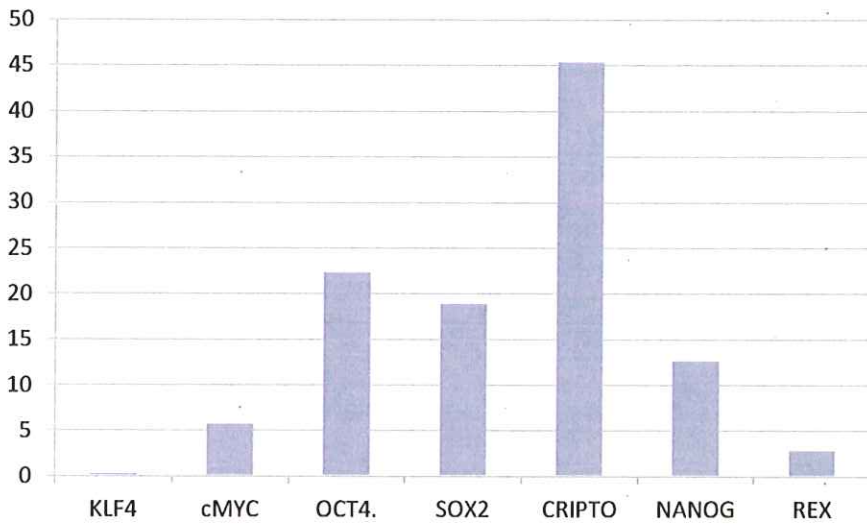


Diferenciación *in vitro* a mesodermo: células positivas para SMA y GATA4.

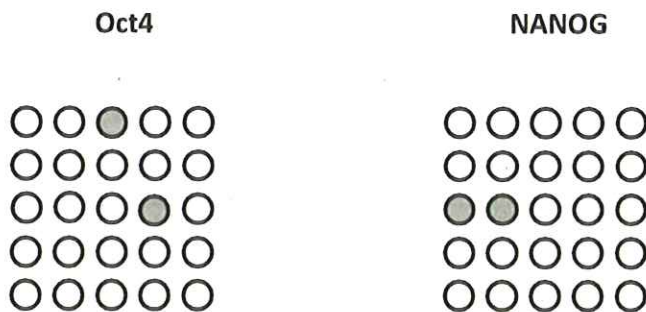


Diferenciación *in vitro* a endodermo: células positivas para AFP y FOXA2.

Anexo 4: reprogramación del perfil de expresión génica y del perfil de metilación del DNA iPS0989#2f

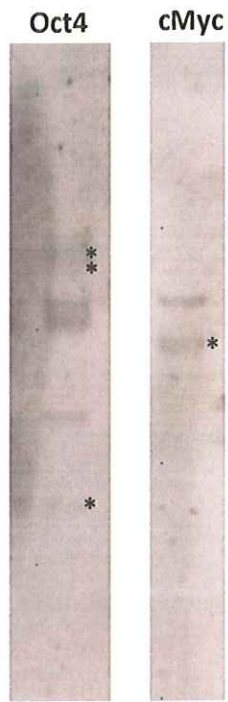


Análisis por q-RT-PCR de los niveles de expresión de los genes endógenos indicados. Se muestra la expresión relativa de GAPDH.

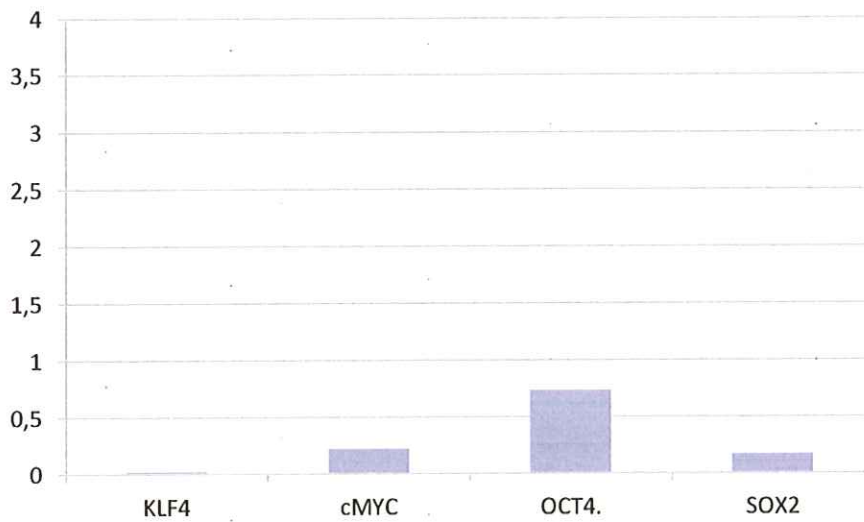


Secuenciación genómica por bisulfito mostrando demetilación de los promotores de Oct4 y NANOG.

Anexo 5: Integración de los transgenes de reprogramación y silenciamiento de los transgenes de reprogramación iPS0989#2f



Análisis por southern blot mostrando las integraciones genómicas (asterisco) de los retrovirus indicados.



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