

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: 11-01-2016

DOCUMENTOS QUE DEBEN ACOMPAÑAR LA SOLICITUD:

Attached documents:

X **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

X **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

X **C. V. del investigador principal (una página; formato libre).**

A one page CV for the Principal Investigator

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>	LND554SV.3
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 primarios obtenidos a partir de una biopsia de piel Primary fibroblasts obtained from a skin biopsy
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre 9 meses Male 9 months
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO SÍ X (especificar) Síndrome de Leigh No Yes (specify) Leigh syndrome
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO SÍ X (especificar) El paciente presenta una mutación en heteroplasmia en el gen <i>MT-ND5</i> (m.13513G>A; p.D393N). Herencia materna. La madre presenta síndrome Wolff-Parkinson White sin síntomas neurológicos. No Yes (specify)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	xFresco <i>Fresh</i>	Crioconservado <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 15-01-2016	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> No se descongeló. It was no defrosted	
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 fibroblastos se han mantenido en DMEM high glucose con FBS hyclone 10%, Penicilina-Streptomocina 1X y glutamax 1X Fibroblasts have been maintained in DMEM high glucose with FBS hyclone 10%, Penicillin-Streptomycin 1X and glutamax 1X	
¿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>	Metodología no integrativa que implica el uso de virus Sendai (CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit). Se han utilizado los factores de reprogramación Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc. Non integrative methodology that involves the use of Sendai virus (CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit, Invitrogen). Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc have been used as reprogramming factors.	
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>	Se han seguido las condiciones de cultivo descritas por Raya A et al. Nature protocols 2010; 5(4): 647-60. Culture conditions are described in detail by Raya A et al. Nature protocols 2010; 5(4): 647-60.	
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>	Las iPSC generadas presentan características morfológicas típicas de células ES (elevada relación núcleo/citoplasma) (Ver ANEXO 1) The generated iPSCs present a typical ES cell colony morphology (high ratio nucleus/cytoplasm) (see ANNEX 1)	
Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Se ha seguido el protocolo descrito en el "CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit". For cryopreserving the iPSC cells the protocol described in the manual of the "CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit" has been followed.	

<p>Pase de la línea celular en el momento del banco/registro. (Máximo: Pase 15) <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>Hay iPSCs congeladas en distintos tiempos Several iPSCs stocks freezed at different moments and passages are available</p>
<p>¿Ha sido la línea modificada genéticamente? <i>Has the line been genetically modified?</i> Sí Yes x No No</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 x No 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> Ver ANEXO 1</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>Oct 4</td> <td>RNA/protein</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>RNA/protein</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td>RNA/protein</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td>Protein</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td>Protein</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-60</td> <td>Protein</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-81</td> <td>Protein</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Fosfatasa. Alk</td> <td>Protein</td> <td></td> <td>20</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>	Oct 4	RNA/protein		20	+		Nanog	RNA/protein		20	+		Sox 2	RNA/protein		20	+		SSEA3	Protein		20	+		SSEA4	Protein		20	+		TRA-1-60	Protein		20	+		TRA-1-81	Protein		20	+		Fosfatasa. Alk	Protein		20	+	
	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																																		
Oct 4	RNA/protein		20	+																																																			
Nanog	RNA/protein		20	+																																																			
Sox 2	RNA/protein		20	+																																																			
SSEA3	Protein		20	+																																																			
SSEA4	Protein		20	+																																																			
TRA-1-60	Protein		20	+																																																			
TRA-1-81	Protein		20	+																																																			
Fosfatasa. Alk	Protein		20	+																																																			
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i> Ver ANEXO 1</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>Protein</td> <td>TUJ1</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>Protein</td> <td>SMA</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td>Protein</td> <td>AFP</td> <td>20</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>	Protein	TUJ1	20	+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Protein	SMA	20	+		Endoderm <i>Endoderm</i>	Protein	AFP	20	+																															
	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>	Protein	TUJ1	20	+																																																			
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	Protein	SMA	20	+																																																			
Endoderm <i>Endoderm</i>	Protein	AFP	20	+																																																			
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i> <i>(espontánea/inducida)</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i> <i>(spontaneous/induced)</i></p>	<p>Esponánea (a las tres capas embrionarias, ver ANEXO 1) Spontaneous differentiation into the three germ layers, see ANNEX 1)</p>																																																						

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="437 152 619 248">Comentarios</th> <th data-bbox="619 152 751 248">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="751 152 884 248">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="884 152 1016 248">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1016 152 1230 248">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1230 152 1436 248"><i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="437 309 619 376">Ectodermo <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="437 414 619 481">Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="437 519 619 586">Endodermo <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>	Ectodermo <i>Ectoderm</i>						Mesodermo <i>Mesoderm</i>						Endodermo <i>Endoderm</i>					
Comentarios	Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	<i>Comments</i>																				
Ectodermo <i>Ectoderm</i>																									
Mesodermo <i>Mesoderm</i>																									
Endodermo <i>Endoderm</i>																									
<p>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>																									
<p>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>Pase 20, cariotipo 46, XY Ver ANEXO 1 Passage 20, karyotype 46, XY See ANNEX 1</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>Se ha llevado a cabo análisis de la huella genética por análisis de microsatélites/STR (ver ANEXO 1) To confirm the cell identity a DNA fingerprinting assay has been carried out (See ANNEX 1)</p>																								
<p>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Los genes no se integran porque se ha utilizado una metodología NO integrativa (virus Sendai) Genes do not integrate. A non-integrative methodology that involves the use of Sendai virus has been used</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>Mostramos por RT-PCR la eliminación de los vectores y factores de reprogramación exógenos (ver ANEXO 1)</p> <p>We confirmed the clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes by RT-PCR (see ANNEX 1)</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>Se ha confirmado la presencia de la mutación en la línea de iPSC generada por secuenciación Sanger (ver ANEXO 1)</p> <p>The presence of the mutation in the iPSC line was evaluated and confirmed by Sanger sequencing (see ANNEX 1)</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Las células se han testado una vez al mes para micoplasma y son negativas por PCR.</p> <p>iPSC cells have been confirmed mycoplasma-free by PCR</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Rafael Garesse Alarcón</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avda. Arzobispo Morcillo s/n</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols UAM-CSIC, Facultad de Medicina</p>	<p>Teléfono (phone): 91-497-54-52</p> <p>Fax: 91 585-44-01</p> <p>E-mail: Rafael.garesse@uam.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):

Otras observaciones o información relevantes (a rellenar por el BNLC):

Other comments or relevant information (to be completed by BNLC)

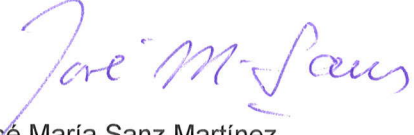

Seguimiento de la línea (a rellenar por el BNLC):

Follow up of the line (to be completed by BNLC)

SECCIÓN 5 DECLARACIÓN

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 <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre</i></p>  <p>José María Sanz Martínez</p> <p>Fecha/ Date: 11-01-2016</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p>  <p>Rafael Garesse Alarcón</p> <p>Fecha /Date 11-01-2016</p>
<p>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> José María Sanz Martínez (Rector UAM)</p>	
<p>Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> C/. Einstein 3, 28049-Madrid</p>	<p>Teléfono /Telephone: 91-497-40-08 Fax: 91-497-67-55 E-mail: rector@uam.es</p>