

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:

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

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>	ARS-FiPS4F1 ESi063-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.</i> <i>Detail cell type, tissue of origin and anatomic location of the biological sample from which the original line is obtained.</i> <i>If cells are commercial, detail name, reference and trade distributor.</i>	Dermal fibroblasts derived from Human Skin Biopsy (upper arm) / Fibroblastos derivados de una biopsia de piel (parte superior del brazo).
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Male Age 14 Varon 14 años
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) No Yes (specify).
¿La patología es de origen genético? <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) c.9938delC (p.G3313Qfs*11) and c.11374C > T (p.R3792*) mutation in compound heterozygosity. No Yes (specify)

Muestra biológica recibida <i>Biological sample</i>	Fresco <input checked="" type="checkbox"/> Crioconservado <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
Fecha de la donación de la muestra biológica <i>Date of donation of the biological sample</i> 5/2015	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 11/2015
Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario). <i>Culture conditions of the original cells (somatic cells / primary culture)</i>	DMEM (Invitrogen 21969-035), 2mM Glutamax (Invitrogen #35050-038), 1x Penstrep, 20% FBS (Gibco #10270-106)
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>	Yes (see Annex)/Si (ver Anexo)
¿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>	Yes/Sí Pase 0 Pase 1 Pase 2 Pase 3 Pase 12
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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	No integrative method. Sendai virus containing four genes: Oct3/4 Sox2 Klf4 cMyc (CytoTune, Thermo Fisher)
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>	Culture on human foreskin feeders. Culture medium: KO DMEM, KSR 20%, Glutamax 2mM, non essential aminoacids 0.1mM, β -mercaptoethanol 0.23mM, basic FGF 10ng/mL and peniciline/streptomycine. Cells were mechanically passaged every 6-8 days. The hiPSCs were adapted to feeder-free cell culture on Matrigel coated plates using mTeSR1 medium
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>	Poligonal colonies 1-2mm diameter large. High nucleus/cytoplasm ratio.

<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Cultivo sobre fibroblastos: Solution A: 50% hESC medium, 50% KSR; Solution B: 80% hESC medium, 20% DMSO (Sol A:Sol B =1:1)</p> <p>Cultivo libre de fibroblastos: Congelados en FBS + 10% DMSO</p> <p>Criopreservados en contenedor de isopropanol a -80°C y posteriormente en nitrógeno líquido. Descongelación rápida a 37°C. Criopreserved in isopropano container at -80°C, over night, and stored in liquid nitrogen the next day. Rapid thawing at 37°C.</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>p10(13) feeder free</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></p> <p>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>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Método <i>Method</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>Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12</td> <td>RT-PCR+ (ver anexo)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12</td> <td>RT-PCR+ (ver anexo)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td>Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12</td> <td>RT-PCR+ (ver anexo)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td>Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; Flow cytometry, pase 12 /passage 12</td> <td>+(ver anexo)</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>	Oct 4	Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12	RT-PCR+ (ver anexo)		Nanog	Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12	RT-PCR+ (ver anexo)		Sox 2	Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12	RT-PCR+ (ver anexo)		SSEA3				SSEA4	Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; Flow cytometry, pase 12 /passage 12	+(ver anexo)	
Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																						
Oct 4	Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12	RT-PCR+ (ver anexo)																							
Nanog	Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12	RT-PCR+ (ver anexo)																							
Sox 2	Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; pase 12 /passage 12	RT-PCR+ (ver anexo)																							
SSEA3																									
SSEA4	Immunocitoquímica/ Immunocytochemistry; Flow cytometry, pase 12 /passage 12	+(ver anexo)																							
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <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</td> <td>Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8/ passage 8</td> <td></td> <td>TUJ-1,+(ver anexo)</td> <td><i>Ectoderm</i></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo</td> <td>Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8/ passage 8</td> <td></td> <td>SMA, +(ver anexo)</td> <td><i>Mesoderm</i></td> </tr> <tr> <td>Endoderm</td> <td>Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8 /passage 8</td> <td></td> <td>FOXA2 +(ver anexo)</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	Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8/ passage 8		TUJ-1,+(ver anexo)	<i>Ectoderm</i>	Mesodermo	Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8/ passage 8		SMA, +(ver anexo)	<i>Mesoderm</i>	Endoderm	Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8 /passage 8		FOXA2 +(ver anexo)					
Método <i>Method</i>	Marcador <i>Marker</i>	Nº pase <i>Passage n</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																					
Ectodermo	Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8/ passage 8		TUJ-1,+(ver anexo)	<i>Ectoderm</i>																					
Mesodermo	Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8/ passage 8		SMA, +(ver anexo)	<i>Mesoderm</i>																					
Endoderm	Immunocitoquímica/Immunocytochemistry, pase 8 /passage 8		FOXA2 +(ver anexo)																						
<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>In vitro differentiation was performed by EB formation, namely the iPSC colonies were lifted manually and cultured in non-adherent conditions in mTeSR1 medium for 48h. Thereafter, the EBs were seeded on glass coverslips treated with 0,1% gelatin for 2 h/RT and cultured during 2 weeks in EB culture medium:</p> <p>KO DMEM (Invitrogen 10829-018); KO SERUM (final concentration 10%) ; Glutamax final (concentration 1% 2mM); NNEE aminoacids (final concentration 1%, 0,1mM); 2-Mercaptoetanol (final concentration 2,23 mM) Penicilin/Estreptomycin (final concentration 1x)</p> <p>The coverslips were fixed 4% PFA for 15 minutes and analyzed by immunofluorescence. Confocal images were taken by Leica SP8.</p>																								

Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="437 143 608 286">Comentarios</th> <th data-bbox="608 143 751 286">Método <i>Method</i></th> <th data-bbox="751 143 895 286">Marcador <i>Marker</i></th> <th data-bbox="895 143 1070 286">Nº pase <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1070 143 1230 286">Resultado <i>Results</i></th> <th data-bbox="1230 143 1449 286">Comentarios <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="437 286 608 595">Ectodermo / <i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="608 286 751 595">/</td> <td data-bbox="751 286 895 595"></td> <td data-bbox="895 286 1070 595"></td> <td data-bbox="1070 286 1230 595"></td> <td data-bbox="1230 286 1449 595"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="437 286 608 595">Mesodermo / <i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="608 286 751 595"></td> <td data-bbox="751 286 895 595"></td> <td data-bbox="895 286 1070 595"></td> <td data-bbox="1070 286 1230 595"></td> <td data-bbox="1230 286 1449 595"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="437 286 608 595">Endodermo / <i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="608 286 751 595"></td> <td data-bbox="751 286 895 595"></td> <td data-bbox="895 286 1070 595"></td> <td data-bbox="1070 286 1230 595"></td> <td data-bbox="1230 286 1449 595"></td> </tr> </tbody> </table>	Comentarios	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>	/					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>	Comentarios <i>Comments</i>																				
Ectodermo / <i>Ectoderm</i>	/																								
Mesodermo / <i>Mesoderm</i>																									
Endodermo / <i>Endoderm</i>																									
Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i>	/																								
Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase) <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i>	Cariotipo normal masculino (ver Anexo) p. Normal male karyotype (see Annex) p. Pase 9																								
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>	Si (ver Anexo) Yes (see Annex)																								
Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i>	Metodo no integrativo Non-integrative method Sendai Virus																								

Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular) <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i>	RT-PCR (Anexo) RT-PCR (Annex)
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>	La presencia de la mutación en la línea de iPSC generada confirmada por secuenciación Sanger (Anexo) The presence of mutation was confirmed by Sanger sequencing (Annex)
Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i>	Negativo (Anexo) Negative (Anexo)

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> Slaven Erceg	Dirección Postal: <i>Postal address:</i> c/Eduardo Primo Yúfera 3, Valencia 46012
Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Centro de Investigacion Principe Felipe	Teléfono (phone): +963289680 Fax: / E-mail: serceg@cipf.es

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>PRINCIPE FELIPE CENTRO DE INVESTIGACION www.cipi.es</p> <p>Fecha / Date:</p>	<p>Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i></p> <p>Slaven Erceg Vukicevic</p>  <p>Fecha /Date</p> <p>13/02/2019</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>