

# 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: 15-06-2016

### 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*

<b>Nombre de la línea iPS</b> <i>Name of the iPS line:</i>	L749.1
<b>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</b> <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 de paciente con Síndrome de Leigh asociado a una mutación en heteroplasmia (90%) en el gen <i>MT-ATP6</i> (m.8993T>G; p.Leu156Arg). Distribuidor comercial: Coriell (GM13411)
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Hombre                      8 meses
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <b>SÍ X</b> (especificar) Síndrome de Leigh <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i>
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <b>SÍ X</b> (especificar) Herencia materna. El paciente presenta una mutación en heteroplasmia (90%) en el gen <i>MT-ATP6</i> (m.8993T>G; p.Leu156Arg). <i>No</i> <i>Yes</i> <i>(specify)</i>

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<p style="text-align: center;"><b>xFresco</b> <i>Fresh</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Crioconservado</b> <i>Cryopreserved</i></p>
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> <b>15-01-2016</b>	<b>Fecha del uso o descongelación</b> <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> No se congeló. Se expandió y una vez conseguidos stocks se fueron almacenando viales en nitrógeno líquido.
<b>Condiciones de cultivo de las células de origen (células somáticas/cultivo primario).</b> <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
<b>¿Hay disponibilidad de viales congelados de las células de origen? ¿En qué pase?</b> <i>Is there availability of frozen vials of original cells? At what passage?</i>	Sí (pase 8)
<b>Método utilizado en la generación de la línea iPSc. (Integrativa/ No-integrativa) Especificar factores y plásmidos de reprogramación utilizados.</b> <i>Method used for the generation of iPSC line (Integrative / Non-integrative)</i> <i>Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	Metodología integrativa que implica el uso de vectores retrovirales. Se han utilizado los factores de reprogramación Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc. El protocolo detallado para la generación de las iPSCs se describe en el artículo publicado por Raya et al., 2010; 5(4): 647-60 (PMID: 20224565).
<b>Condiciones de cultivo de la línea de iPSc generada. (si se describen en publicación, indicar referencia)</b> <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 (PMID: 20224565).
<b>Descripción de las características morfológicas de la línea en cultivo (forma y tamaño colonias; forma y tamaño células; ratio núcleo/citoplasma; otros)</b> <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)
<b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b> <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Se ha seguido el protocolo de congelación descrito en el "CytoTune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit"

<p><b>Pase de la línea celular en el momento del banco/registro. (Máximo: Pase 15)</b>  <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>Hay iPSCs congeladas en distintos tiempos</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i>  <b>Sí</b> Yes      x <b>No</b> No</p> <p><b>Comentarios/ Comments:</b></p>	<p><b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b>  <i>Has a clonal analysis been carried out?</i></p> <p><b>Sí/ Yes</b>    x <b>No</b>      <b>Resultado / Result</b></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><b>Test de pluripotencia</b>  <i>Pluripotency test</i>  <b>Ver ANEXO 1</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><b>Método</b> <i>Method</i></th> <th><b>Marcador</b> <i>Marker</i></th> <th><b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i></th> <th><b>Resultado</b> <i>Results</i></th> <th><b>Comentarios</b> <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Oct 4</b></td> <td>RNA/proteína</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Nanog</b></td> <td>RNA/proteína</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Sox 2</b></td> <td>RNA/proteína</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>SSEA3</b></td> <td>Proteína</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>SSEA4</b></td> <td>Proteína</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>TRA-1-60</b></td> <td>Proteína</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>TRA-1-81</b></td> <td>Proteína</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Fosfatasa. Alk</b></td> <td>Proteína</td> <td></td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>	<b>Oct 4</b>	RNA/proteína		20	+		<b>Nanog</b>	RNA/proteína		20	+		<b>Sox 2</b>	RNA/proteína		20	+		<b>SSEA3</b>	Proteína		20	+		<b>SSEA4</b>	Proteína		20	+		<b>TRA-1-60</b>	Proteína		20	+		<b>TRA-1-81</b>	Proteína		20	+		<b>Fosfatasa. Alk</b>	Proteína		20	+	
	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n.</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>																																																		
<b>Oct 4</b>	RNA/proteína		20	+																																																			
<b>Nanog</b>	RNA/proteína		20	+																																																			
<b>Sox 2</b>	RNA/proteína		20	+																																																			
<b>SSEA3</b>	Proteína		20	+																																																			
<b>SSEA4</b>	Proteína		20	+																																																			
<b>TRA-1-60</b>	Proteína		20	+																																																			
<b>TRA-1-81</b>	Proteína		20	+																																																			
<b>Fosfatasa. Alk</b>	Proteína		20	+																																																			
<p><b>Test de diferenciación in vitro</b>  <i>In vitro differentiation test</i>  <b>Ver ANEXO 1</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><b>Método</b> <i>Method</i></th> <th><b>Marcador</b> <i>Marker</i></th> <th><b>Nº pase</b> <i>Passage n</i></th> <th><b>Resultado</b> <i>Results</i></th> <th><b>Comentarios</b> <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i></td> <td>Proteína</td> <td>TUJ1</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td>Proteína</td> <td>SMA</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i></td> <td>Proteína</td> <td>AFP</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	Proteína	TUJ1	20	+		<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	Proteína	SMA	20	+		<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	Proteína	AFP	20	+																															
	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>																																																		
<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>	Proteína	TUJ1	20	+																																																			
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	Proteína	SMA	20	+																																																			
<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	Proteína	AFP	20	+																																																			
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i></b>  <i>(espontánea/inducida)</i>   <i>Description of the differentiation characteristics in vitro</i>  <i>(spontaneous/induced)</i></p>	<p>Espontánea (a las tres capas embrionarias, ver ANEXO 1)</p>																																																						

<p><b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="435 152 619 248"><b>Comentarios</b></th> <th data-bbox="619 152 754 248"><b>Método</b> <i>Method</i></th> <th data-bbox="754 152 890 248"><b>Marcador</b> <i>Marker</i></th> <th data-bbox="890 152 1026 248"><b>Nº pase</b> <i>Passage n</i></th> <th data-bbox="1026 152 1233 248"><b>Resultado</b> <i>Results</i></th> <th data-bbox="1233 152 1444 248"><b>Comentarios</b> <i>Comments</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="435 248 619 405"><b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 405 619 517"><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 517 619 600"><b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	<b>Comentarios</b>	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>	<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>						<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>						<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>					
<b>Comentarios</b>	<b>Método</b> <i>Method</i>	<b>Marcador</b> <i>Marker</i>	<b>Nº pase</b> <i>Passage n</i>	<b>Resultado</b> <i>Results</i>	<b>Comentarios</b> <i>Comments</i>																				
<b>Ectodermo</b> <i>Ectoderm</i>																									
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>																									
<b>Endodermo</b> <i>Endoderm</i>																									
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vivo</i></b> <i>Description of the differentiation characteristics in vivo</i></p>																									
<p><b>Cariotipo (especificar fórmula cariotípica y pase)</b> <i>Karyotype (Specify karyotype formula and passage)</i></p>	<p>Pase 20, cariotipo 46, XY Ver ANEXO 1</p>																								
<p><b>Identificación celular: Huella genética por análisis de microsatélites/STR de la línea celular</b> <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)</p>																								
<p><b>Test de integración (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b> <i>Integration Test (specify method depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>No realizado</p>																								

<p><b>Test de silenciamiento (detallar método utilizado según tipo de reprogramación celular)</b>  <i>Silencing Test (specify method used depending on cell reprogramming)</i></p>	<p>Se ha confirmado el silenciamiento de los transgenes retrovirales por RT-PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para los factores de transcripción transgénicos o endógenos OCT4, SOX2 and KLF4 (ver ANEXO 1)</p>
<p><b>Confirmación del diagnóstico genotípico en las iPSC generadas a partir de muestras con mutación genética</b>  <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 (ver ANEXO 1)</p>
<p><b>Test de micoplasma</b>  <b><i>Mycoplasma Test</i></b></p>	<p>Las células se han testado una vez al mes para micoplasma y son negativas por PCR.</p>

### SECCIÓN 3      DATOS DEL DEPOSITANTE

*Section 3      Applicant Details*

<p><b>Investigador Principal:</b>  <i>Principal Investigator:</i>  Rafael Garesse Alarcón</p>	<p><b>Dirección Postal:</b>  <i>Postal address:</i>  Avda. Arzobispo Morcillo 4</p>
<p><b>Centro de Trabajo:</b>  <i>Institution:</i>  Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols  UAM-CSIC, Facultad de Medicina, Universidad  Autónoma de Madrid</p>	<p><b>Teléfono (phone): 91-497-54-52</b>  <b>Fax: 91-585-44-01</b>  <b>E-mail: rafael.garesse@uam.es</b></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)

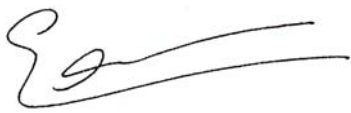
**Seguimiento de la línea** (a rellenar por el BNLC):

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.*

<b>Firma en Representación del Centro / Signature in Representation of the Centre</b> <i>(Representante legal del Departamento/Centro)</i> <i>Legal Representative of the Department/Centre)</i>  José María Sanz Martínez  Fecha/ Date: 15-06-2016	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i>    Rafael Garesse Alarcón Fecha /Date 15-06-2016
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> <b>José María Sanz Martínez (Rector UAM)</b>	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i>  C/. Einstein 3, 28049-Madrid	<b>Teléfono /Telephone:</b> 91-497-40-08 <b>Fax:</b> 91-497-67-55 <b>E-mail:</b> rector@uam.es