

**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:** 9/12/2016

**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*

<b>Nombre de la línea iPS</b> <i>Name of the iPS line:</i>	CMT2-FiPS4F1
<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>	Biopsia de piel, parte superior del brazo Skin biopsy, upper outer arm
<b>Sexo y edad del donante.</b> <i>Sex and age of the donor</i>	Varón 45 Male 45
<b>¿El donante tiene alguna patología?</b> <i>Has the donor any pathological condition?</i>	<b>NO</b> <input type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Charcot-Marie-Tooth 2K <i>No Yes (specify)</i>
<b>¿La patología es de origen genético?</b> <i>Is the pathological condition of genetic origin?</i>	<b>NO</b> <input type="checkbox"/> <b>SÍ</b> <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Autosómica recesiva. Mutaciones en heterocigosis en el gen GDAP1 (p.Q163X / p.T288NfsX3). Autosomic Recessive. Heterozygous mutations in GDAP1 gene (p.Q163X/p.T288NfsX3) <i>No Yes (specify)</i>

<b>Muestra biológica recibida</b> <i>Biological sample</i>	<b>Fresco</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Crioconservado</b> <input type="checkbox"/> <i>Fresh</i> <i>Cryopreserved</i>
<b>Fecha de la donación de la muestra biológica</b> <i>Date of donation of the biological sample</i> Julio 2013	<b>Fecha del uso o descongelación</b> ( <i>si congelado</i> ) <i>Date used or thawed (if frozen)</i> Septiembre 2013 September 2013
<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>	Fibroblastos dermales humanos crecidos en DMEM 10%FBS Primary human dermal fibroblasts cultured in DMEM 10%FBS
<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 1 Yes, pass 1
<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) Specify factors and plasmids used for reprogramming</i>	No integrativa, Cytotune 2.0 kit (Thermo Scientific) Non integrative, Cytotune 2.0 kit (Thermo Scientific)
<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>	Martí, Salvador, León, Marian, Orellana, Carmen, Prieto, Javier, Ponsoda, Xavier, Lóopez-García, Carlos, Vílchez, Juan Jesús, Sevilla, Teresa, Torres, Josema, Generation of a disease-specific iPS cell line derived from a patient with Charcot-Marie-Tooth type 2K lacking functional GDAP1 gene, Stem Cell Research (2016), doi:10.1016/j.scr.2016.11.017
<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>	Morfología indistinguible de células madre embrionarias humanas Morphology indistinguishible from human Embryonic Stem cells
<b>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación)</b> <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i>	Congelación en DMEM-F12 20%KSR y 10%DMSO Freezing in DMEM-F12 20%KSR and 10%DMSO

<p><b>Pase de la línea celular en el momento del banqueo/registro. (Máximo: Pase 15)</b>  <i>Passage at the time of the banking/registration (Max: Passage 15)</i></p>	<p>Pase 4  Pass 4</p>
<p><b>¿Ha sido la línea modificada genéticamente?</b>  <i>Has the line been genetically modified?</i>  <b>Sí Yes</b> <input type="checkbox"/> <b>No No</b> <input checked="" type="checkbox"/>  <b>Comentarios/ Comments:</b></p>	<p><b>¿Se llevó a cabo un análisis clonal?</b>  <i>Has a clonal analysis been carried out?</i>  <b>Sí/ Yes</b> <input type="checkbox"/> <b>No</b> <input checked="" type="checkbox"/> <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></p> <p>Mediante análisis por Inmunofluorescencia (IF) o PCR cuantitativa de células creciendo exponencialmente</p> <p>By Immunofluorescence (IF) or quantitative PCR (qPCR) analysis of exponentially growing cells</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>IF/qPCR</td> <td></td> <td>pass 4;</td> <td>positive</td> <td>IF nuclear</td> </tr> <tr> <td><b>Nanog</b></td> <td>IF/qPCR</td> <td></td> <td>pase 4;</td> <td>positive</td> <td>IF nuclear</td> </tr> <tr> <td><b>Sox 2</b></td> <td>IF/qPCR</td> <td></td> <td>pase 4;</td> <td>positive</td> <td>IF nuclear</td> </tr> <tr> <td><b>SSEA3</b></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>SSEA4</b></td> <td>IF</td> <td></td> <td>pase4;</td> <td>positive</td> <td>IF membrane</td> </tr> <tr> <td><b>TRA-1-60</b></td> <td>IF</td> <td></td> <td>pase4;</td> <td>positive</td> <td>IF membrane</td> </tr> <tr> <td><b>TRA-1-81</b></td> <td>IF</td> <td></td> <td>pase4;</td> <td>positive</td> <td>IF membrane</td> </tr> <tr> <td><b>Fosfatasa. Alk</b></td> <td></td> <td></td> <td></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>	IF/qPCR		pass 4;	positive	IF nuclear	<b>Nanog</b>	IF/qPCR		pase 4;	positive	IF nuclear	<b>Sox 2</b>	IF/qPCR		pase 4;	positive	IF nuclear	<b>SSEA3</b>						<b>SSEA4</b>	IF		pase4;	positive	IF membrane	<b>TRA-1-60</b>	IF		pase4;	positive	IF membrane	<b>TRA-1-81</b>	IF		pase4;	positive	IF membrane	<b>Fosfatasa. Alk</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>Oct 4</b>	IF/qPCR		pass 4;	positive	IF nuclear																																																		
<b>Nanog</b>	IF/qPCR		pase 4;	positive	IF nuclear																																																		
<b>Sox 2</b>	IF/qPCR		pase 4;	positive	IF nuclear																																																		
<b>SSEA3</b>																																																							
<b>SSEA4</b>	IF		pase4;	positive	IF membrane																																																		
<b>TRA-1-60</b>	IF		pase4;	positive	IF membrane																																																		
<b>TRA-1-81</b>	IF		pase4;	positive	IF membrane																																																		
<b>Fosfatasa. Alk</b>																																																							
<p><b>Test de diferenciación in vitro</b> <i>In vitro differentiation test</i></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>IF/qPCR</td> <td>betaIII-tub/Pax6</td> <td>pass 4</td> <td>positive</td> <td>Embryoid Body</td> </tr> <tr> <td><b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i></td> <td>IF/qPCR</td> <td>SMA/MSX1</td> <td>pass 4</td> <td>positive</td> <td>Embryoid Body</td> </tr> <tr> <td><b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i></td> <td>IF/qPCR</td> <td>AFP/AFP</td> <td>pass 4</td> <td>positive</td> <td>Embryoid Body</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>	IF/qPCR	betaIII-tub/Pax6	pass 4	positive	Embryoid Body	<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	IF/qPCR	SMA/MSX1	pass 4	positive	Embryoid Body	<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	IF/qPCR	AFP/AFP	pass 4	positive	Embryoid Body																														
	<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>	IF/qPCR	betaIII-tub/Pax6	pass 4	positive	Embryoid Body																																																		
<b>Mesodermo</b> <i>Mesoderm</i>	IF/qPCR	SMA/MSX1	pass 4	positive	Embryoid Body																																																		
<b>Endoderm</b> <i>Endoderm</i>	IF/qPCR	AFP/AFP	pass 4	positive	Embryoid Body																																																		
<p><b>Descripción de las características de diferenciación <i>in vitro</i></b> <i>(espontánea/inducida)</i></p> <p><i>Description of the differentiation characteristics in vitro (spontaneous/induced)</i></p>	<p>Pluripotencia evaluada mediante la generación y cultivo de cuerpos embrioides en suspensión durante 15 días (para el análisis por qPCR). Luego, los cuerpos embrioides se sembraron sobre cristales recubiertos con matrigel y se cultivaron durante 7 días adicionales para su análisis por IF. Durante su cultivo en adherencia, se observó la contracción espontánea de las masas celulares en alguno de ellos, indicando la presencia de cardiomiocitos.</p> <p>Pluripotency evaluated by marker expression analysis of cells differentiated in Embryoid Bodies (EBs). Markers assessed by qPCR were analysed upon 15 days of EB in suspension culture. Markers assessed by IF were analysed upon 7 days of adherent culture following 15 days of EB formation grown in suspension. During the adherent culture we observed some spontaneously beating cells, an indicative of cardiomyocyte differentiation.</p>																																																						

<p><b>Test de diferenciación in vivo</b> <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="435 152 754 219"><b>Método</b></th> <th data-bbox="754 152 914 219"><b>Marcador</b></th> <th data-bbox="914 152 1074 219"><b>Nº pase</b></th> <th data-bbox="1074 152 1444 219"><b>Resultado</b></th> </tr> <tr> <td data-bbox="435 219 754 286"><b>Comentarios</b></td> <td data-bbox="754 219 914 286"><i>Method</i></td> <td data-bbox="914 219 1074 286"><i>Marker</i></td> <td data-bbox="1074 219 1444 286"><i>Passage n</i></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 286 754 353"></td> <td data-bbox="754 286 914 353"></td> <td data-bbox="914 286 1074 353"></td> <td data-bbox="1074 286 1444 353"><i>Results</i></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 353 754 421"></td> <td data-bbox="754 353 914 421"></td> <td data-bbox="914 353 1074 421"></td> <td data-bbox="1074 353 1444 421"><i>Comments</i></td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="435 421 754 488"><b>Ectodermo</b></td> <td data-bbox="754 421 914 488"></td> <td data-bbox="914 421 1074 488"></td> <td data-bbox="1074 421 1444 488"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 488 754 555"><i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="754 488 914 555"></td> <td data-bbox="914 488 1074 555"></td> <td data-bbox="1074 488 1444 555"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 555 754 622"><b>Mesodermo</b></td> <td data-bbox="754 555 914 622"></td> <td data-bbox="914 555 1074 622"></td> <td data-bbox="1074 555 1444 622"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 622 754 689"><i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="754 622 914 689"></td> <td data-bbox="914 622 1074 689"></td> <td data-bbox="1074 622 1444 689"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 689 754 757"><b>Endodermo</b></td> <td data-bbox="754 689 914 757"></td> <td data-bbox="914 689 1074 757"></td> <td data-bbox="1074 689 1444 757"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="435 757 754 824"><i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="754 757 914 824"></td> <td data-bbox="914 757 1074 824"></td> <td data-bbox="1074 757 1444 824"></td> </tr> </tbody> </table>	<b>Método</b>	<b>Marcador</b>	<b>Nº pase</b>	<b>Resultado</b>	<b>Comentarios</b>	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>				<i>Results</i>				<i>Comments</i>	<b>Ectodermo</b>				<i>Ectoderm</i>				<b>Mesodermo</b>				<i>Mesoderm</i>				<b>Endodermo</b>				<i>Endoderm</i>			
<b>Método</b>	<b>Marcador</b>	<b>Nº pase</b>	<b>Resultado</b>																																						
<b>Comentarios</b>	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>																																						
			<i>Results</i>																																						
			<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>Convencional por bandas G a pase 4 (46, XY). Conventional G-banding analysis at passage 4 (46, XY).</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>Fingerprinting. Marcadores/Markers:DXS7132, GATA31E08, DYS390, GATA175D03, DXS6789,</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, Reprogramación no integrativa con cytotune 2.0 NO, Non integrative reprogramming using Cytotune 2.0</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>qPCR análisis para detectar la presencia de secuencias correspondientes a los 4 factores exógenos (OCT4/SOX2/KLF4/MYC) utilizados y secuencias de virus Sendai  qPCR expression analysis to detect the presence of the 4 exogenous factors (OCT4/SOX2/KLF4/MYC) used for reprogramming and Sendai virus sequences.</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>Sí. Confirmada la presencia de las mutaciones p.Q163X / p.T288NfsX3 en GDAP1 en heterocigosis mediante secuenciación Sanger en los fibroblastos originales y en la línea CMT2-FiPS4F1.  YES. Mutations are present in the CMT2-FiPS4F1 cell line as well as in the fibroblasts used for cell reprogramming. GDAP1 (p.Q163X/p.T288NfsX3) mutations analysed by Sanger sequencing.</p>
<p><b>Test de micoplasma</b>  <b><i>Mycoplasma Test</i></b></p>	<p>Sí, negativa  YES, negative</p>

### SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE

*Section 3 Applicant Details*

<p><b>Investigador Principal:</b>  <i>Principal Investigator:</i>  José Manuel Torres Ibáñez</p>	<p><b>Dirección Postal:</b>  <i>Postal address:</i>  Dr. Moliner, 50; Burjassot 46100</p>
<p><b>Centro de Trabajo:</b>  <i>Institution:</i>  Dpto. Biología Celular, Facultad de Biología;  Universidad de Valencia</p>	<p><b>Teléfono (phone):</b> 963543925  <b>Fax:</b> 963543049  <b>E-mail:</b> josema.torres@uv.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):

Descripción de la generación de la línea obtenida en:

Martí, Salvador, León, Marian, Orellana, Carmen, Prieto, Javier, Ponsoda, Xavier, Lóopez-García, Carlos, Vílchez, Juan Jesús, Sevilla, Teresa, Torres, Josema,

Generation of a disease-specific iPS cell line derived from a patient with Charcot-Marie-Tooth type 2K lacking functional GDAP1 gene, Stem Cell Research (2016), doi:10.1016/j.scr.2016.11.017

CMT2-FiPS4F1 description published in:

Martí, Salvador, León, Marian, Orellana, Carmen, Prieto, Javier, Ponsoda, Xavier, Lóopez-García, Carlos, Vílchez, Juan Jesús, Sevilla, Teresa, Torres, Josema,

Generation of a disease-specific iPS cell line derived from a patient with Charcot-Marie-Tooth type 2K lacking functional GDAP1 gene, Stem Cell Research (2016), doi:10.1016/j.scr.2016.11.017.

#### **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 / Legal Representative of the Department/Centre)</i> José del Ramo  Fecha /Date: 9/12/16 	<b>Firma del Investigador Principal</b> <i>Signature of the Principal Investigator</i> José Manuel Torres Ibáñez  Fecha /Date: 9/12/16
<b>Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro:</b> <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> Director del Depto. Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física	
<b>Dirección Postal:</b> <i>Postal Address:</i> Depto. Biología Celular, Biología Funcional y antropología Física Fac. Biología Eb-B; planta-4 Burjassot 46100	<b>Teléfono /Telephone:</b> 963544681 <b>Fax:</b> 963543049 <b>E-mail:</b> isabel.herrera@uv.es