

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: 07/10/2019

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>	DOA2259-FiPS4F-8
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>	Fibroblastos primarios humanos obtenidos a partir de una biopsia de piel. Human primary fibroblasts obtained from a skin biopsy.
Sexo y edad del donante. <i>Sex and age of the donor</i>	Varón Nacido en 1988
¿El donante tiene alguna patología? <i>Has the donor any pathological condition?</i>	NO <input type="checkbox"/> SÍ <input checked="" type="checkbox"/> (especificar) Atrofia óptica. Optic atrophy <i>No</i> <i>Yes (specify)</i>
¿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) Es causada por una mutación en el gen ACO2 NM_001098 c.1999G>A; p.Glu667Lys The disease is caused by a mutation in the gene ACO2 NM_001098 c.1999G>A; p.Glu667Lys <i>No</i> <i>Yes (specify)</i>

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> 27/07/2017	Fecha del uso o descongelación <i>(si congelado)</i> <i>Date used or thawed (if frozen)</i> 30/10/2018 La muestra se expandió y una vez conseguidos stocks se fueron almacenando viales en nitrógeno líquido. The samples was thawed and expanded for the generation of a stock. After, several cryovials with frozen cells were stored in liquid nitrogen.
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-Streptomycina 1X y glutamax 1X. Fibroblasts have been maintained in DMEM high glucose with FBS hyclone 10%, Penicilin-Streptomycin 1X and glutamax 1X.
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>	Se ha llevado a cabo análisis de la huella genética por análisis de microsatélites/STR D2S1338, D7S820, D8S1179, D13S317, D19S433, D21S11, VWA, Amelogenin (ver anexo II) To confirm the cell identity a DNA fingerprinting assay has been carried out using D2S1338, D7S820, D8S1179, D13S317, D19S433, D21S11, VWA, Amelogenin STRs (see annex II)
¿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>	Si, (pase 9) Yes (passage 9)
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>	Metodología no integrativa que implica el uso de virus Sendai (Cyto Tune iPSc 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 (Cyto Tunes-iPSc 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>iPSc 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 et al. Nature protocols 2010; 5(4): 647-60

<p>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></p>	<p>Las iPSC generadas presentan características morfológicas típicas de células ES (elevada relación núcleo/citoplasma (ver anexo I))</p> <p>The generated iPSCs present a typical ES cell colony morphology (high ratio nucleus/cytoplasm (see Annex I)).</p>
<p>Criopreservación de la línea celular (Describir método de congelación/descongelación) <i>Cryopreservation of the cell line (Describe freezing / thawing method)</i></p>	<p>Se ha seguido el protocolo descrito en el "Cyto Tune-iPS 2.0 Sendai reprogramming kit"</p> <p>For cryopreserving the iPSC cells the protocol described in the manual of the "Cyto Tune-iPS Sendai reprogramming kit" has been followed.</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>El pase depositado es 9 en feeder</p> <p>The passage is 9 in feeder.</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> 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></th> <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>qPCR/ICC (inmunocitoquímica/ immunocytochemistry)</td> <td></td> <td></td> <td>20 +</td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>qPCR/ICC</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sox 2</td> <td>qPCR/ICC</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA3</td> <td>Not analysed</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>SSEA4</td> <td>ICC</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-60</td> <td>ICC</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRA-1-81</td> <td>ICC</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Fosfatasa. Alk</td> <td>Ensayo actividad</td> <td></td> <td>20</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	qPCR/ICC (inmunocitoquímica/ immunocytochemistry)			20 +	Nanog	qPCR/ICC	20	+		Sox 2	qPCR/ICC	20	+		SSEA3	Not analysed				SSEA4	ICC	20	+		TRA-1-60	ICC	20	+		TRA-1-81	ICC	20	+		Fosfatasa. Alk	Ensayo actividad		20	+
	Método <i>Method</i>	Nº pase <i>Passage n.</i>	Resultado <i>Results</i>	Comentarios <i>Comments</i>																																										
Oct 4	qPCR/ICC (inmunocitoquímica/ immunocytochemistry)			20 +																																										
Nanog	qPCR/ICC	20	+																																											
Sox 2	qPCR/ICC	20	+																																											
SSEA3	Not analysed																																													
SSEA4	ICC	20	+																																											
TRA-1-60	ICC	20	+																																											
TRA-1-81	ICC	20	+																																											
Fosfatasa. Alk	Ensayo actividad		20	+																																										
<p>Test de diferenciación in vitro <i>In vitro differentiation test</i></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>ICC</td> <td>TUJ1</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mesodermo <i>Mesoderm</i></td> <td>ICC</td> <td>SMA</td> <td>20</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Endoderm <i>Endoderm</i></td> <td>ICC</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>	ICC	TUJ1	20	+		Mesodermo <i>Mesoderm</i>	ICC	SMA	20	+		Endoderm <i>Endoderm</i>	ICC	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>	ICC	TUJ1	20	+																																										
Mesodermo <i>Mesoderm</i>	ICC	SMA	20	+																																										
Endoderm <i>Endoderm</i>	ICC	AFP	20	+																																										
<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>Espontánea a las tres capas embrionarias, (ver anexo I)</p> <p>Spontaneous differentiation into the three germ layers, (see annex I).</p>																																													

<p>Test de diferenciación in vivo <i>In vivo differentiation test</i></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="443 185 603 241">Método</th> <th data-bbox="603 185 762 241">Marcador</th> <th data-bbox="762 185 922 241">Nº pase</th> <th data-bbox="922 185 1442 241">Resultado</th> </tr> <tr> <td data-bbox="443 241 603 286">Comentarios</td> <td data-bbox="603 241 762 286"><i>Method</i></td> <td data-bbox="762 241 922 286"><i>Marker</i></td> <td data-bbox="922 241 1442 286"><i>Passage n</i></td> </tr> <tr> <td data-bbox="443 286 603 331"></td> <td data-bbox="603 286 762 331"></td> <td data-bbox="762 286 922 331"></td> <td data-bbox="922 286 1442 331"><i>Results</i></td> </tr> <tr> <td data-bbox="443 331 603 376"></td> <td data-bbox="603 331 762 376"></td> <td data-bbox="762 331 922 376"></td> <td data-bbox="922 331 1442 376"><i>Comments</i></td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="443 376 603 421">Ectodermo</td> <td data-bbox="603 376 762 421"></td> <td data-bbox="762 376 922 421"></td> <td data-bbox="922 376 1442 421"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="443 421 603 465"><i>Ectoderm</i></td> <td data-bbox="603 421 762 465"></td> <td data-bbox="762 421 922 465"></td> <td data-bbox="922 421 1442 465"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="443 465 603 510">Mesodermo</td> <td data-bbox="603 465 762 510"></td> <td data-bbox="762 465 922 510"></td> <td data-bbox="922 465 1442 510"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="443 510 603 555"><i>Mesoderm</i></td> <td data-bbox="603 510 762 555"></td> <td data-bbox="762 510 922 555"></td> <td data-bbox="922 510 1442 555"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="443 555 603 600">Endodermo</td> <td data-bbox="603 555 762 600"></td> <td data-bbox="762 555 922 600"></td> <td data-bbox="922 555 1442 600"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="443 600 603 645"><i>Endoderm</i></td> <td data-bbox="603 600 762 645"></td> <td data-bbox="762 600 922 645"></td> <td data-bbox="922 600 1442 645"></td> </tr> </tbody> </table>	Método	Marcador	Nº pase	Resultado	Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>				<i>Results</i>				<i>Comments</i>	Ectodermo				<i>Ectoderm</i>				Mesodermo				<i>Mesoderm</i>				Endodermo				<i>Endoderm</i>			
Método	Marcador	Nº pase	Resultado																																						
Comentarios	<i>Method</i>	<i>Marker</i>	<i>Passage n</i>																																						
			<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>No se ha llevado a cabo por considerarse un ensayo que ya no es necesario para demostrar la pluripotencialidad de las células.</p> <p>This assay has not been carried out. At this moment it is considered that this assay is not essential to demonstrate the pluripotency of the cells.</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 I)</p> <p>Passage 20, Karyotype 46, XY (see annex I)</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 D2S1338, D7S820, D8S1179, D13S317, D19S433, D21S11, VWA, Amelogenin (ver anexo I (Tabla 1), y anexo 2)</p> <p>To confirm the cell identity a DNA fingerprinting assay has been carried out using D2S1338, D7S820, D8S1179, D13S317, D19S433, D21S11, VWA, Amelogenin STRs (annex I (table 1) and annex 2)</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)</p> <p>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 I)</p> <p>We confirmed the clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes by RT-PCR (see annex I)</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 las mutaciones en la línea de iPSC generada por secuenciación Sanger (ver anexo 1 (figura 1)).</p> <p>The presence of the mutations in the iPSC line was evaluated and confirmed by Sanger sequencing (see annex 1 (figure 1))</p>
<p>Test de micoplasma <i>Mycoplasma Test</i></p>	<p>Las células son micoplasma negativas por PCR (ver figura suplementaria I)</p> <p>iPSC cells have been confirmed mycoplasma-free by PCR (see supplementary figure 1)</p>

SECCIÓN 3 DATOS DEL DEPOSITANTE
Section 3 Applicant Details

<p>Investigador Principal: <i>Principal Investigator:</i> CARMEN AYUSO GARCÍA</p>	<p>Dirección Postal: <i>Postal address:</i> Avenida Reyes Católicos 2</p>
<p>Centro de Trabajo: <i>Institution:</i> Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz</p>	<p>Teléfono (phone): Fax: E-mail: cayuso@fjd.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

Confirmando 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.

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>	Firma del Investigador Principal <i>Signature of the Principal Investigator</i>
08/10/19	Fecha /Date 08/10/19
Nombre y Cargo de la Persona Representante del Centro: <i>Name and Position of the Person Representing the Centre:</i> JA Álvaro de Parra	
Dirección Postal: <i>Postal Address:</i> Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid	Teléfono /Telephone: 915504897 Fax: E-mail: investigación@fjd.es